CANADA'S NATURAL RESOURCES
NOW AND FOR THE FUTURE
www.nrcan.gc.ca

Principles of mass culture of the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae: Siphoninae)

F. Wolfgang Quednau and Karl Lamontagne

Laurentian Forestry Centre
Information Report LAU-X-121
(revised version 2003)

Natural Resources Canada
Canadian Forest Service
Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts

Canada

103-06283/

Principles of mass culture of the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae: Siphoninae)

F. Wolfgang Quednau and Karl Lamontagne

Information Report LAU-X-121
(revised version 2003)

Natural Resources Canada
Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Centre
Sainte-Foy, Quebec

CANADIAN CATALOGUING IN PUBLICATION DATA

Quednau, F.W.

Principles of mass culture of the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae: Siphoninae).

(Information report; LAU-X-121)
Issued also in French under title: Méthodes d'élevage de masse pour la mouche *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve)
Includes bibliographical references.
ISBN 0-662-31075-6
Cat. No. Fo46-18/121-2003E

1. *Aphantorhaphopsis samarensis* -- Breeding -- Quebec (Province) -- Sainte-Foy.
2. Gypsy moth -- Biological control -- North America.
3. Forest insects -- Biological control -- North America.
I. Lamontagne, Karl.
II. Laurentian Forestry Centre.
III. Title.
IV. Series: Information report (Laurentian Forestry Centre); LAU-X-121.

SB945.G9Q8313 1998 634.9'6774 C98-980259-0

© Her Majesty the Queen in Right of Canada 2003
Catalog Number Fo46-18/121-2003E
ISBN 0-662-31075-6
ISSN 0835-1570

Limited additional copies of this publication are available at no charge from:
Natural Resources Canada
Canadian Forest Service
Laurentian Forestry Centre
1055 du P.E.P.S., P.O. Box 3800
Sainte-Foy, Quebec G1V 4C7
LFC Web Site: http://www.cfl.scf.rncan.gc.ca

Copies or microfiches of this publication may be purchased from:
Micromedia Ltd.
240 Catherine St., Suite 305
Ottawa, Ontario K2P 2G8
Tel.: (613) 237-4250
Toll free: 1-800-567-1914
Fax: (613) 237-4251

Cette publication est également offerte en français sous le titre «Modèle d'élevage de masse pour la mouche *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera : Tachinidae : Siphoninae), un parasitoïde de la spongieuse» (Numéro de catalogue Fo46-18/121-2003F).

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT vii

RÉSUMÉ vii

INTRODUCTION 1

REARING METHODS 1
The host plant 1
The host insect 4
The parasitoid 6

REARING OPERATIONS 19

FACILITIES 19

ACKNOWLEDGMENTS 24

REFERENCES 24

LIST OF TABLES

Table 1. *Aphantorhaphopsis samarensis* rearings in 1996 22

Table 2. Mortality of *A. samarensis* puparia 23

Table 3. Principal mortalities in *A. samarensis* rearings 23

LIST OF FIGURES

Figure 1. Concept of host-parasite interaction 2

Figure 2. Sprouted acorns of red oak (*Quercus rubra*) 3

Figure 3. Plastic basin and metal screening to hold cups with small oak trees 3

Figure 4. Office space equipped with fluorescent lights to grow small oak trees 3

Figure 5. Egg masses of gypsy moth (*Lymantria dispar*) laid on paper 5

Figure 6. Egg masses submerged in formaldehyde solution and plastic cylinder to retain egg masses during washing 5

Figure 7. Rapid water exchange system for washing out formaldehyde 5

Figure 8. Plastic container (type 1) for rearing large numbers of gypsy moth larvae on diet 6

Figure 9. SOLO cups in incubator used to rear, on artificial diet, gypsy moth larvae that have been exposed to *A. samarensis* 7

Figure 10. Parts of compound rearing cup (type 3) designed to separate mature parasitoid larvae from non-parasitized caterpillars 7

Figure 11. Life cycle of *A. samarensis* in the laboratory 7

Figure 12. Eclosion cage 8

Figure 13. Cages for holding male and female parasitoids and for copulation 8

Figure 14. Gestation and host exposure cage 9

Figure 15. Large host exposure cages in rearing room equipped with automatic mist dispersion system 9

Figure 16. Utensils for feeding and capturing *A. samarensis* adults 10

Figure 17. Puparia in peat in eclosion cage 11

Figure 18. Shell vials, stoppered, containing *A. samarensis* flies 11

Figure 19. *A. samarensis*, eclosion pattern of 1119 post-hibernation puparia 11

(LIST OF FIGURES - Cont'd)

Figure 20. *A. samarensis*, eclosion pattern of 1074 non-hibernating, second-generation puparia 12

Figure 21. Ventral view of abdomen in *A. samarensis* to show genitalia 13

Figure 22. Mating cages installed over water basins with plastic coverings to retain high humidity 13

Figure 23. Copulation of *A. samarensis* 14

Figure 24. Removal of *A. samarensis* pair in copula from mating cage by means of a cardboard strip 14

Figure 25. Water basin to accommodate flies from mating cages until the end of coitus in a humid atmosphere 14

Figure 26. Large tulle cover over wire hoops to prevent flies from escaping 14

Figure 27. Mature *A. samarensis* maggots that have bored out of their hosts 17

Figure 28. Rearing cups with parasitized gypsy moth larvae 17

Figure 29. Puparia of *A. samarensis* on autoclaved peat in Petri dish 18

Figure 30. Plastic container to hold puparia of *A. samarensis* in a Petri dish with peat in a water-saturated atmosphere for hibernation 18

Figure 31. Pharate adult of *A. samarensis* taken out of its puparium 18

Figure 32. *A. samarensis*, yield of a second-generation rearing in 100 host exposure cages 18

Figure 33. *A. samarensis* rearing operations and abiotic environmental requirements 20

Figure 34. Timetable for events during *A. samarensis* rearing in the laboratory 21

Quednau, F.W.; Lamontagne, K. 2002. Principles of mass culture of the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae: Siphoninae). Nat. Resour. Can., Can. For. Serv., Laurentian For. Cent., Sainte-Foy, Que. Inf. Rep. LAU-X-121 (revised version).

ABSTRACT

Techniques for rearing the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) are described. The biological characteristics of the host plant, the host insect, and the parasitoid are outlined and data on productivity are presented. The necessary working equipment and facilities are illustrated.

Quednau, F.W.; Lamontagne, K. 2002. Méthodes d'élevage de masse pour la mouche *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera : Tachinidae : Siphoninae), un parasitoïde de la spongieuse. Ressour. nat. Can., Serv. can. for., Cent. for. Laurentides, Sainte-Foy, Qc. Rapp. inf. LAU-X-121F (version révisée).

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent des techniques d'élevage de masse applicables au parasitoïde *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) et présentent les caractéristiques biologiques de la plante-hôte, de l'insecte-hôte et du parasitoïde, ainsi que des données sur la productivité. Des illustrations du matériel et des installations d'élevage sont fournies.

INTRODUCTION

A cooperative research program in biological control between the International Institute of Biological Control and the Canadian Forest Service has led to the discovery and importation of the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis*[1] (Diptera: Tachinidae). This parasitoid appears to be both univoltine in nature and virtually host-specific to gypsy moth, giving it desirable attributes for biological control. It is associated with low-density populations of gypsy moth in central Europe and has been credited with the capacity of maintaining gypsy moth populations at relatively low-density levels and even preventing an outbreak of the host insect (Mills *et al.* 1986, 1989; Mills and Nealis 1992). After having been attacked by *A. samarensis*, the gypsy moth larva succumbs during an early instar before major defoliation occurs in the field.

This association of *A. samarensis* with low-density levels of its host makes it difficult to secure sufficient material for release directly from field collections. In 1989, a colony of the parasitoid was established at the Laurentian Forestry Centre of the Canadian Forest Service in Sainte-Foy, Quebec, with the objective of identifying the biological requisites of the species for mass culture (Quednau 1993) and of providing material for initial field releases (Nealis and Quednau 1996). Since 1991, thousands of puparia of *A. samarensis* have been reared and European wild populations of this fly have been infused to improve the genetic quality of stock. The purpose of this report is to outline in more detail the methods of rearing this beneficial insect as part of a novel approach for biological control of the gypsy moth in North America.

Aphantorhaphopsis samarensis is a difficult insect to rear in captivity. Techniques are complex and labour-intensive. Critical innovations developed in our laboratory and described in detail in this report are:

- Provision of natural host-finding stimuli. Second- and third-instar host larvae are exposed to the parasitoid while feeding on tender oak foliage.

- Continuous supply of host plants. Young oak trees grown from acorns are stored, once tender foliage has been grown, at 7°C for a maximum of 2 months.

- Continuous supply of host larvae. Egg masses of the gypsy moth are incubated on artificial diet. The ensuing caterpillars, once they attain second instar, are stored at 7°C for a maximum of 40 days, during which time they feed very little.

- Rapid exchange of host material. A new type of cage with a detachable bottom was developed, allowing for quick rotation of host insects.

- Separation of free parasitoids from unparasitized host larvae. A new type of rearing container was developed to separate the free, mature parasitoid larvae from unparasitized caterpillars.

- Manipulation of facultative diapause response. Diapause in *A. samarensis* is prevented when puparia, once formed, are held at 20-25°C. If diapausing puparia for hibernation are needed, rearing rooms are set at fluctuating day and night temperatures and the puparia, once formed, are stored at 13.5°C for 1-2 months until the insects have attained the pharate adult stage, then cooled down further.

REARING METHODS

Three components must be provided for the perfect interaction of the parasitoid with its host: plants on which the host insects are exposed to the ovolarviposition fly, hosts of suitable instar, and the parasitoid ready to produce progeny (Fig. 1).

The host plant

Red oak (*Quercus rubra* L.) is the most suitable species because of the development of large, tender leaves; also European oak (*Quercus robur* L.) can be used, but foliage hardens sooner. Mature seeds (acorns) are collected in large quantities in fall from suitable sites where older, healthy trees produce plenty of seeds. As many as 20,000 acorns (ten 20 L buckets) may be needed for one year's *A. samarensis* rearing. A careful selection of the acorns should be made. When immersed in water for 24 h, the healthy seeds fall to the bottom of the container. The acorns are held for a few days on newsprint paper at room temperature until they look dry. During this time curculionid (weevil) larvae may exit infested seeds.

[1] Formerly known as *Ceranthia samarensis*. As pointed out by Anderson (1983, 1996) and O'Hara (1989, 1998), the genus *Ceranthia* was split off as a monophyletic taxon from another group including *Aphantorhaphopsis* Townsend, 1926, which is heterogenous (polyphyletic) and which contains the species *samarensis*, originally described as *Actia samarensis* Villeneuve, 1921.

For stratification at 2-4°C and 95% relative humidity, storage containers must allow gas exchange with the atmosphere while maintaining high acorn moisture levels. Polyethylene bags 0.006 mm (0.004") thick or less (size 45 x 100 cm) are recommended (Bonner 1992) to allow aeration and to release CO_2 by the acorns during stratification. The acorns can be stored in this condition for at least 9 months. Minimum hibernation time is 2 months. As the storage period is extended for 1 year or longer, percentage germination may be reduced. However, Bonner (1992) reports viability without critical losses up to 3 years.

For germination, the acorns are brought to room temperature (20-22°C) in the greenhouse and mixed with an equal volume of moist PRO-MIX soil. Light is excluded and humidity retained by pulling a black plastic bag over the container. Depending on the length of cold storage, it may take from 2 weeks to 2 months until the roots begin to show (Fig. 2). The acorns are planted 2 cm deep, horizontally with roots pointing down, in styrofoam drinking cups (7 cm upper diameter, 9 cm high) with four holes in the bottom. The soil composition is black top soil (2.5 parts), PRO-MIX (2 parts) and peat moss (0.5 parts); the soil should be neither too heavy nor too light. The plants must be watered at least twice a week, never allowing the soil to dry out. In order to maintain the roots in a humid atmosphere, a plastic basin measuring 50 x 38 x 12 cm (Rubbermaid Canada) with metal screening on a wooden frame is used to hold the plants 2 cm from the bottom of the basin, which is filled with water up to the level of the screening (Fig. 3). Approximately 30 cups are placed upright on the screen and the roots eventually penetrate the holes in the cups. Losses of up to 40% may occur after planting the hibernated acorns. Surplus sprouted acorns in moist PRO-MIX can be returned to the cold room and planted later.

For optimal growth, conditions are 22°C and ordinary fluorescent lighting at 17:7 (L:D) h photoperiod. The greenhouse must be painted white in summer to reduce heat radiation from the glass. Light intensity should be moderate and sodium lamps should be avoided because they dry out the air. Foliage will develop after 3-6 weeks, but may take longer if the night temperature is not maintained at 20°C. If a greenhouse is not available, office space equipped with fluorescent lights giving an intensity of about 20 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$ at the level of the plants may be used instead (Fig. 4). After tender foliage is grown, the plants are stored in a humidified cold room (7°C) under the same lighting conditions, and can be used for up to 2 months after which the foliage hardens and becomes unsuitable for the gypsy moth larvae, which prefer succulent leaves as food.

Having plenty of fresh foliage available for the exposure of the gypsy moth larvae to the parasitoid is the basis of the rearing. Acorns must be available and germinated well ahead of time.

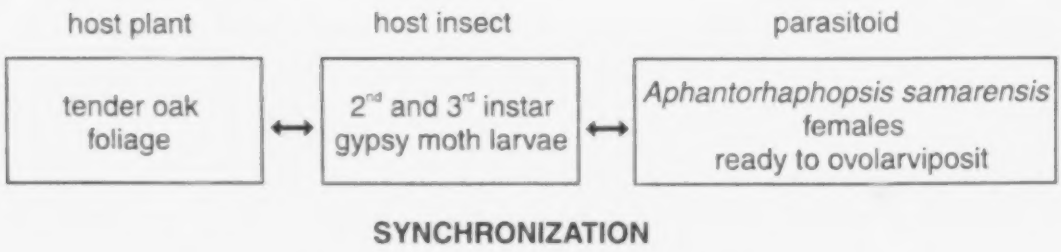

Figure 1. Concept of host-parasite interaction.

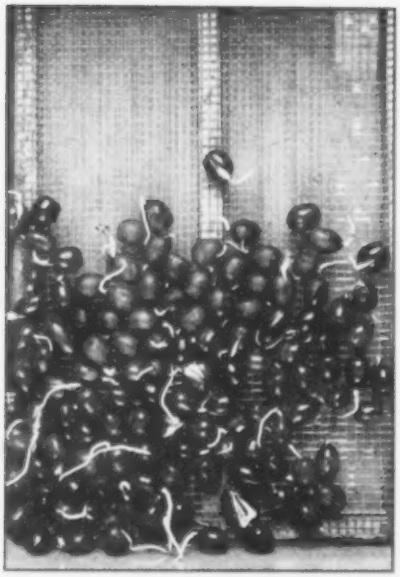

Figure 2. Sprouted acorns of red oak (*Quercus rubra*).

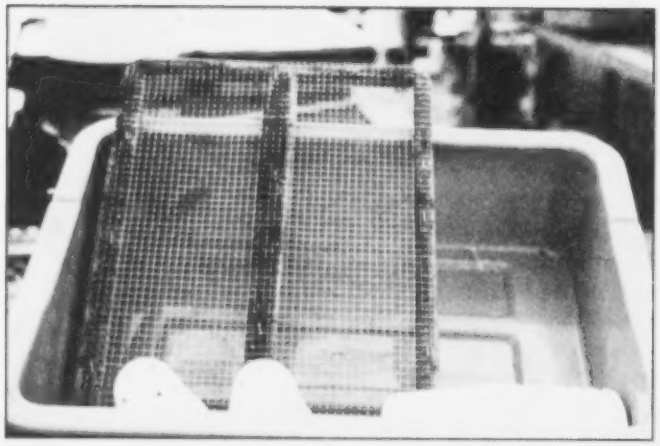

Figure 3. Plastic basin and metal screening to hold cups with small oak trees.

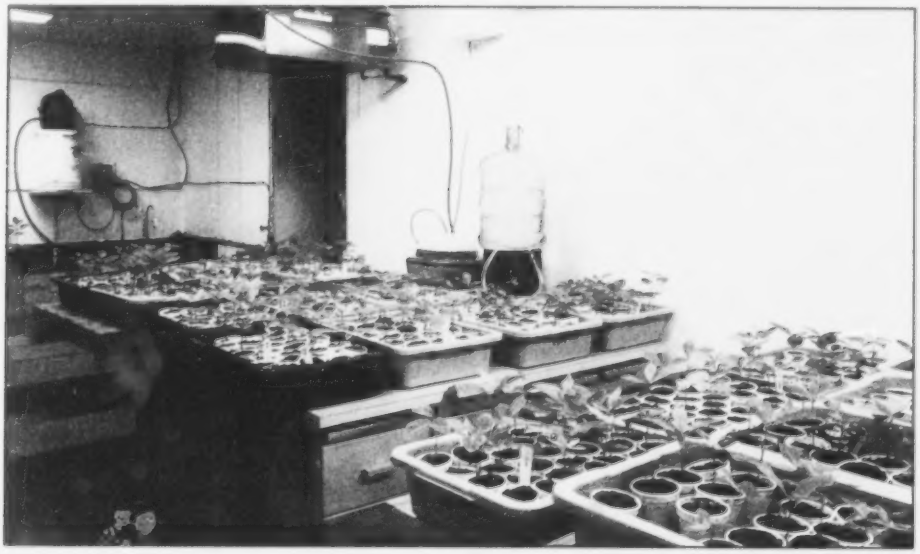

Figure 4. Office space equipped with fluorescent lights to grow small oak trees.

The host insect

Gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) eggs can be collected in the fall at sites where the insect occurs naturally at fairly high density. Egg masses are stored at 2-4°C (humidified) for at least 4 months (diapause) before the eggs are ready to eclose at 25°C; otherwise, incubation time will be prolonged. A disadvantage of using egg masses collected in the wild is the considerable mortality caused by severe frost if the eggs collected in late winter or early spring were not protected by snow. At the Laurentian Forestry Centre, laboratory-reared (supplied as a courtesy of USDA Otis Methods Development Center, Otis ANGB, MA, USA) gypsy moth egg masses were used. These egg masses (Fig. 5) were laid on brown kraft paper and stored in the cold for 6-7 months; under these conditions, the eggs hatch in 2 days at 25°C.

Very large numbers of 2nd- and 3rd-instar host larvae are needed for efficient production of the parasitoid. The following points have to be observed:

- Storage of post-diapause egg masses. Egg masses about 175-250 days in diapause can be stored at 5-7°C (humidified) for a period of 1½ months. During the latter half of this period, percentage eclosion is progressively reduced.

- Surface sterilization of egg masses. In order to reduce the incidence of nuclear polyhedrosis virus, the egg masses are dipped in 10% v/v formaldehyde solution (10 cc of commercial 37% w/w HCHO diluted in water until 100 cc) for 1 h and rinsed for 2 h in flowing water (Odell *et al.* 1985) before incubation. The egg masses are removed from the paper with a spatula, immersed, 100 egg masses at a time, in a beaker with wire screening slightly below the surface of the solution to keep the eggs submerged (Fig. 6, left). To rinse out the formaldehyde, egg masses are placed in plastic cylinders (10 x 5 cm) with wire screening on the bottom and a snap-on lid (Fig. 6, right). The cylinders are held immersed in the water tank by pieces of heavy angle iron. Rapid exchange of tap water is ensured by pieces of plastic hose fitted on opposite sides of the tank (Fig. 7). After washing, the egg masses are placed on diet and incubated.

- Preparation of diet. Formulation of diet (Bell *et al.* 1981) is as follows:

Water	1200 mL
Agar	22.5 g
Casein	37.5 g
Salt mix (Wesson)	12.0 g
Sorbic acid	3.0 g
Methyl paraben	1.5 g
Wheat germ	180.0 g
Vitamin premix (Vanderzant)	15.0 g

This recipe makes about 1400 mL of diet. Boil water in a 3 L saucepan; add the agar and return to a boil. Add casein, salt mix, sorbic acid and methyl paraben; stir well to dissolve the methyl paraben. Return to a boil and add wheat germ; if the mixture starts to foam add the remainder of the wheat germ to stop it. Before adding the vitamins, the mixture should be boiled for 10-30 s to destroy the enzymes (lipases) that break down important nutrients for the caterpillars. Pour the mixture into a blender (Waring commercial blender, 2 L capacity) and add vitamins, stirring to dissolve them. Blend for 2 min at high speed; pour into appropriate rearing cups.

- Rearing cups. Three different types of rearing cups were used:

Type 1.
Plastic ERA containers (made by Eraware, Ville Saint-Laurent, QC, square, 908 mL, with tight-fitting covers. The covers are perforated on the periphery with about 100 holes of 0.68 mm diameter, small enough that neonate gypsy moth larvae cannot escape. The inner side of the cover or the bottom of the container is filled with diet 0.5 cm deep. These units are used to incubate egg masses and feed the ensuing larvae until 2nd instar. One recipe of diet is sufficient for 20 containers (Fig. 8). Unfortunately, when these containers are washed and reused, the covers no longer close hermetically and neonate gypsy moth larvae may escape. To prevent this, cloth tape may be used for sealing the cracks or the containers must be replaced by new ones.

Figure 5. Egg masses of gypsy moth (*Lymantria dispar*) laid on paper.

Figure 6. Left: egg masses submerged in formaldehyde solution. Right: plastic cylinder to retain egg masses during washing.

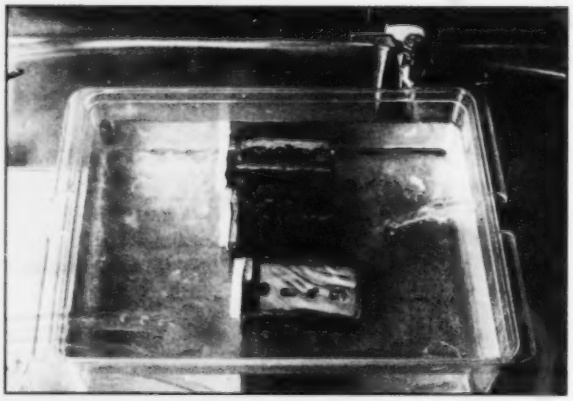

Figure 7. Rapid water exchange system for washing out formaldehyde.

Type 2. (disposable)
Semi-transparent, 163 mL soufflé cups (No. P550) with plastic snap-on lids (No. PL5) (made by SOLO Cup Company, Urbana, IL, USA) filled 0.5 cm deep with diet (Fig. 9). These cups are used to feed the smaller host larvae as they have been collected from foliage in the host exposure cages.

Type 3. (disposable)
Compound rearing container, a SOLO cup as above with about 15 holes (0.25 cm diameter) in the bottom to allow the mature fly maggots to fall through and collect on the bottom of a styrofoam drinking cup that is firmly pushed over the SOLO cup for hermetic sealing. Diet for the gypsy moth larvae is placed on the inner side of the snap-on lid. The parts of this container are held firmly together with a rubber band (Fig. 10).

The rearing cups and lids with diet can be stored for at least 2 weeks at 2-8°C, so that a supply is always available.

- Rearing host larvae on diet. One to three surface-sterilized egg masses are placed in a type 1 container and incubated at 25°C and 35-60% relative humidity. About 40 containers are needed to accommodate 100 egg masses. After eclosion, it takes another 7 days at this temperature to obtain the 2nd-instar larvae, recognizable by their pitch black colour. Before the larvae have reached 2nd instar, it is advisable to redistribute the material of each unit into two new containers with fresh diet. This will reduce contamination and the possibility that the insects will feed on their excrement. Once the host insects have reached 2nd instar, the containers are stored at 7°C; at this temperature the larvae feed very little and a continuous supply is available over 1-1½ months. However, rapid utilization of the larvae in the host exposure cages is recommended, so that no molds will develop during this time, and if they occur, the cultures should be discarded. Due to periodic exposure to room temperature during the collection of larvae needed for exposure to the parasitoids, 2nd instars will eventually molt to the 3rd instar. This is not a disadvantage, because the latter are equally suitable as hosts for *A. samarensis*.

  The good condition of the host larvae is of utmost importance for obtaining attacks by the parasitoid and the production of healthy puparia of *A. samarensis*.

The parasitoid

Biology of *A. samarensis*. *Aphantorhaphopsis samarensis* is an ovolarviparous endoparasitoid. Eggs are deposited on the bristles of 2nd- and 3rd-instar gypsy moth larvae. The neonate parasitoid larva quickly penetrates the host cuticle and develops in the hemocoele, forming a respiratory funnel that produces a dark circular scar on the caterpillar. There are three larval stages and moulting takes place in the respiratory funnel. Development is rapid (Fig. 11). Under laboratory conditions, 8-14 days after the host has been attacked, the mature parasitoid larva bores out of the host. Pupariation is completed within the next 12 h. In non-hibernating cohorts, total generation time from egg to adult is 20-26 days at 25°C, and 33-40 days at 20:15°C (12:12 h; day:night). In nature, *A. samarensis* is univoltine with the possibility of a partial second generation in unusually hot summers. In the laboratory, the dormant state is facultative and diapause does not occur if puparia, once formed, are stored at 20°C. The number of progeny (puparia) produced over the lifetime of a *A. samarensis* female is 30-100 puparia, and the average longevity of the parasitoid is about 40 days (Quednau 1993).

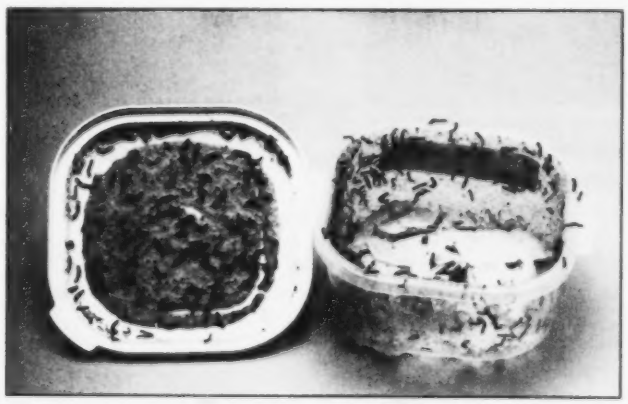

Figure 8. Plastic container (type 1) for rearing large numbers of gypsy moth larvae on diet.

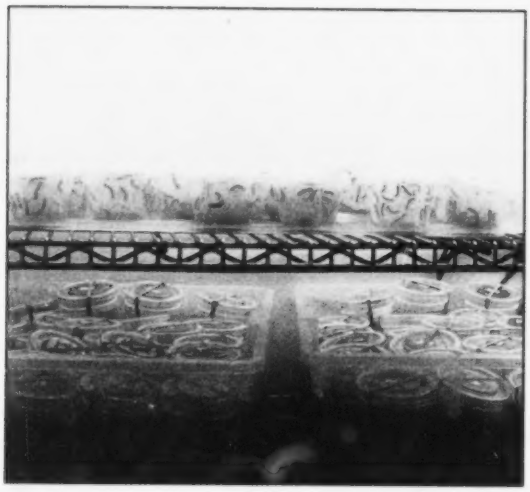

Figure 9. SOLO cups in incubator to rear, on artificial diet, gypsy moth larvae that have been exposed to *A. samarensis*. Upper shelf: simple cups (type 2). Lower shelf: compound cups (type 3).

Figure 10. Parts of compound rearing cup (type 3) designed to separate mature parasitoid larvae from non-parasitized caterpillars. Note the artificial diet on inner side of lid. Left: assembled unit.

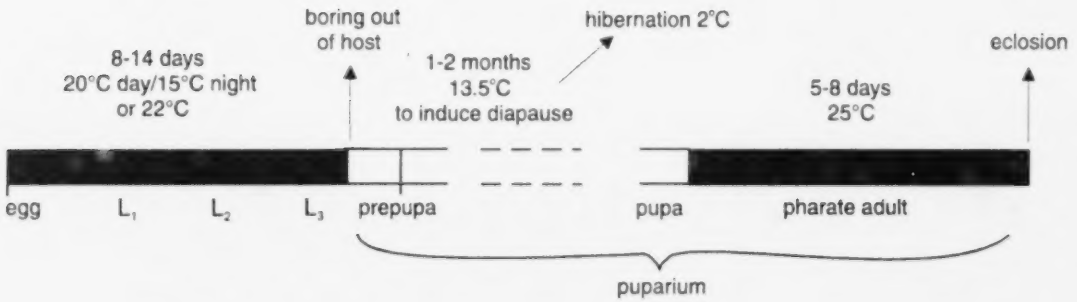

Figure 11. Life cycle of *A. samarensis* in the laboratory.

- Confinement cages for adults. *Aphantorhaphopsis samarensis* adults are frail and delicate, swift and elusive in flight. Their bodies dehydrate quickly, and they require very high humidity in the atmosphere to survive well. The flies drink water frequently. The basic design for the cages was taken from Odell and Godwin (1979). It was modified by a tulle covering to prevent damage to the flies' wings and permit better aeration.

Three types of cages were used:

1. Eclosion cage (Fig. 12). This cage ensures that adults eclose in a water-saturated atmosphere and that the flies alight on tulle and not on hard surfaces. Bottom part: same basin (Rubbermaid) as used to hold small oak trees, filled with water. Top part: plastic base cut from upper half of Rubbermaid basin, with tulle over wire hoops fitted in plastic (plexiglass) triangles held by screws in corners; the bottom is a piece of nylon screening (Nitex Nylon Monofilament Bolting Cloth, Fabric Number HC3-475, 14 strands/cm; SEFA Canada, Ville Saint-Laurent, QC) glued to the plastic frame with Bostic glue stick, and a foam rubber band is also glued over the edges for better sealing. Tulle can also be used instead of nylon screening, but smaller insects may fall through into the water. The cage measures 37 x 50 x 55 cm and a plastic bag is pulled over it and tightly fastened at the lower edge. An opening of 16 cm is provided to introduce the dish with the puparia and make it possible to reach in at arm's length to collect the insects; this opening is closed with a foam rubber plug. The cage is hermetically fastened over the water basin by means of four large Foldback 1414 clamps.

2. Cage for holding males and females after eclosion and during mating (Fig. 13). Made of tulle glued with Bostic glue stick over wire hoops with solid plastic (plexiglass) bottom, dimensions 25 x 25 x 18 cm. An opening of 4 cm in diameter is cut on one side and closed with a foam rubber plug; the opening allows access to the cage to introduce a small water basin with a dental cotton wick (Fig. 16, centre) and to introduce and recapture flies.

3. Gestation and host exposure cage (Fig. 14). The top part is composed of tulle over wire hoops attached to a plastic frame. The frame is made by cutting a 23 x 30 x 40 cm plastic box (T-295, Althor Products, Bethel, CT, USA) in thirds horizontally. The wires are glued with epoxy through holes in the corners of the frames or through 6-mm-thick plexiglass triangles glued at the corners of the cage. The detachable bottom is made of 38-mm-thick styrofoam (for best results use Cladmate XL Styrofoam, Dow Canada) with four openings of 5 cm in diameter to hold four small potted oak trees. The cage must fit tightly over the styrofoam to prevent insects from escaping. For that reason a foam rubber band is glued on the inner side of the plastic frame of the top part. Two openings are cut in the tulle at one side; one hole is cut 3 cm in diameter near the top to introduce the flies; the second opening, 10 cm in diameter, is cut lower down and is large enough for a person to reach in and remove the parasitoids. Both openings are closed with a foam rubber plug. A larger model of this cage, 45 x 32 x 55 cm, was also used and the frame is made of the same material as that of the eclosion cages (Fig. 15).

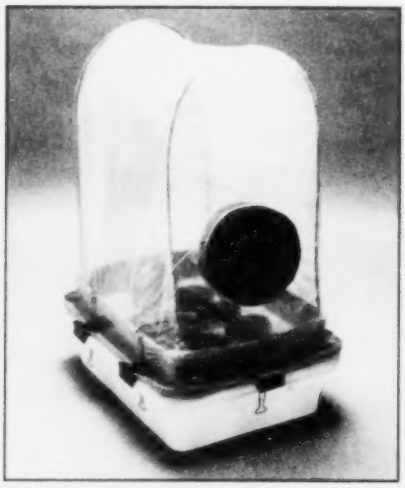

Figure 12. Eclosion cage.

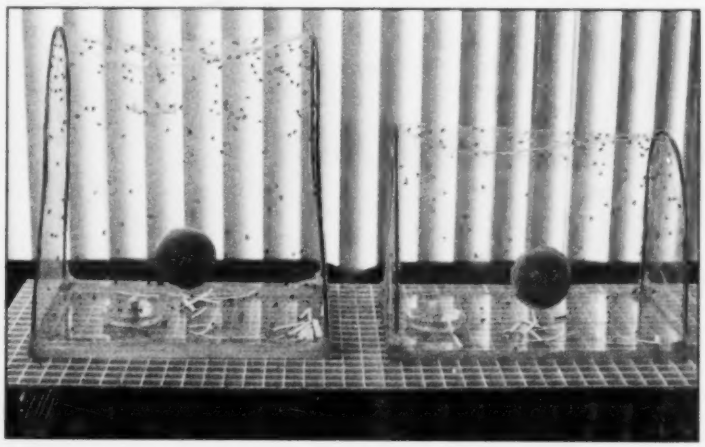

Figure 13. Cages for holding male and female parasitoids and for copulation.

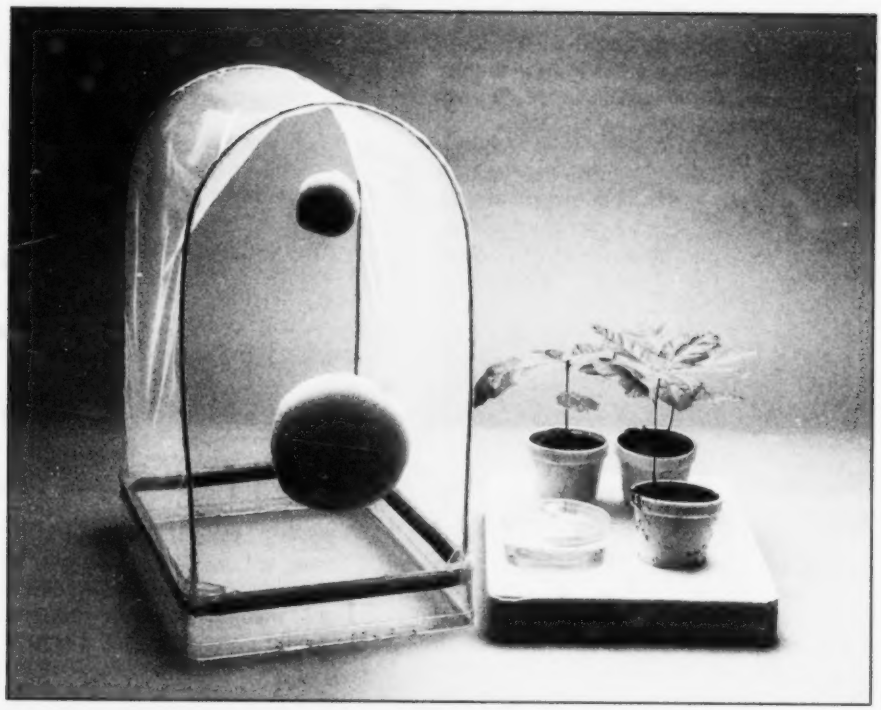

Figure 14. Gestation and host exposure cage. Left: top part made of tulle; note foam rubber band for hermetic closure. Right: bottom part made of styrofoam with small oak trees and dental cotton wick in water.

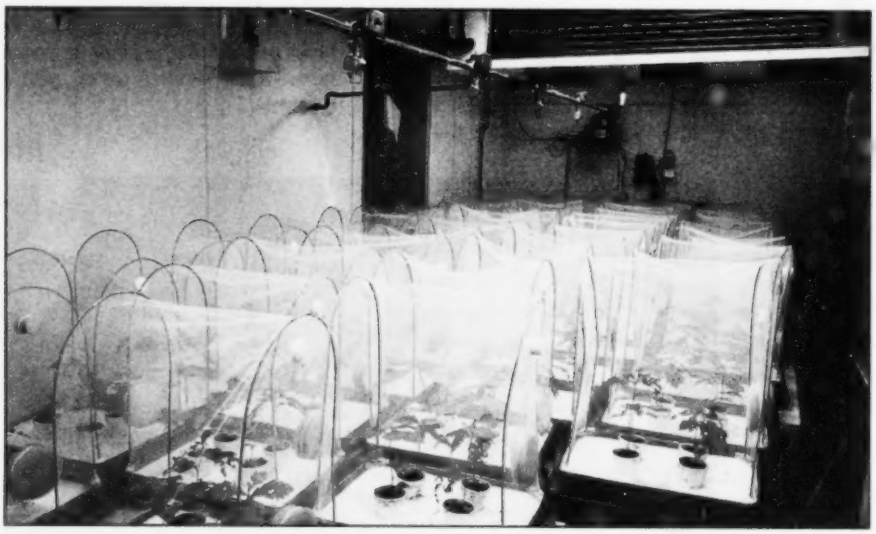

Figure 15. Large host exposure cages in rearing room equipped with automatic mist dispersion system.

- Food for the adult flies. A dental cotton wick soaked in distilled water contained in a small Petri dish (No. 1006 Falcon by Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA) is placed in each type 2 cage (Fig. 16, centre). In the host exposure cage, a larger cylindrical container (8.25 x 8.25 cm, Althor Products No. R15) is used for the dental cotton wick (Fig. 16, upper row, left). In addition, honey-agar jelly is spread on top of the tulle cages. The composition of the jelly is as follows:

Water	130 mL
Honey	10 g
Sugar	20 g
Agar	0.55 g

Ingredients are added to cold water and under constant stirring the solution is slowly heated to the boiling point, then removed from the stove to prevent it from becoming too concentrated. It is poured into a large plastic dish (Falcon Plastics, 150 x 25 mm). After cooling in the refrigerator, the jelly can be distributed with a pipette which is kept clean in a shell vial glued to the petri dish cover (Fig. 16, upper row, centre). The medium should be stored in the refrigerator and prepared fresh every 2 weeks. Distilled water is atomized on the cages at least twice a day.

- Eclosion. Post-hibernation puparia are kept first for 5 days at 15°C; non-hibernated ones are transferred directly to 22-25°C and 18:6 h (D:L) photoperiod. Puparia in wet peat inside a plastic Petri dish (Falcon Plastics, 150 x 25 mm) are placed on the screening in the eclosion cage (Figs. 12 and 17). The peat is sufficiently wet when no more surplus water is dripping off. The humidity inside the eclosion cage should be near 100%. As eclosion commences, the insects are collected twice a day, individually, using a clean, dry 35 x 10 mm shell vial (1 fly per vial), which is stoppered with a foam plug (Fig. 18). After each collection, distilled water is sprayed on the puparia so the peat never dries out. In post-hibernation cohorts, a protandric pattern of eclosion is observed (Fig. 19). In non-hibernating cohorts, males and females eclose simultaneously (Fig. 20). In post-hibernation cohorts, especially in those that did not have uniform lengths of diapause at 2°C, the range between male and female eclosions is sufficiently large, so that later virtually all females can be mated. Minimum hibernation requirement at 2°C is 100 days. In this latter case, eclosions at 22°C may extend over a period of 30 days or more. The shorter the hibernation, the longer it takes for the pharate adults to eclose.

- Sexing. Insects are held in shell vials and sexed using a hand lens. The genital armature of the *A. samarensis* male is brown and sclerotized in a fold of the ventral posterior abdomen (claspers); the female's abdomen has a smooth, slightly tubular tip (Fig. 21). Males and females are placed in separate cages, 40-60 flies per cage. The males are held at 22:15°C (12:12 h; day:night) with ordinary fluorescent lighting of about 2 μmol· $s^{-1}m^{-2}$ intensity at the level of the cage for 3 days until maturity. The females are held at 15°C in dim light to reduce their activity until needed for mating. Eclosion date must be shown on the cages and new cages are used every day so the age of the flies is precisely known. To remove a female from its cage, a wire handle is fitted around a shell vial to serve as a "spoon" so the fly will fall in when touched gently (Fig. 16, lower row, centre).

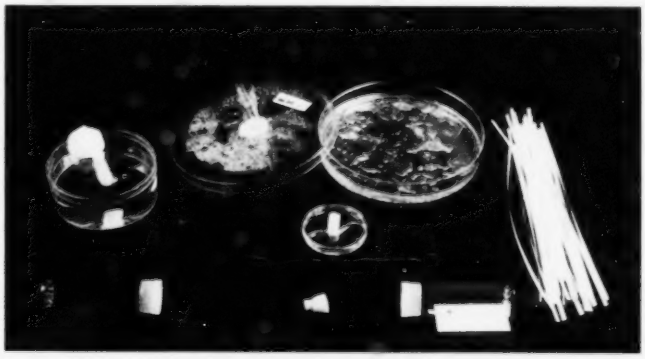

Figure 16. Utensils for feeding and capturing *A. samarensis* adults. Upper row, left: large container with water and dental cotton wick; centre: honey-agar jelly in Petri dish with distributor pipette; centre below: small Petri dish with water and dental cotton wick; right: cardboard paper strips. Lower row, left: butyrate vial with perforated bottom and polyethylene lid; centre: small shell vial with foam plug and "spoon" for capturing flies.

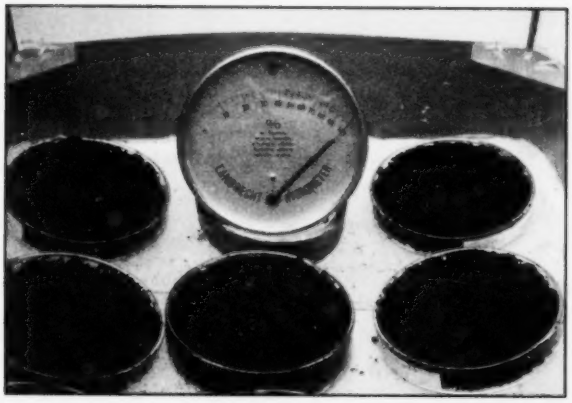

Figure 17. Puparia in wet peat in eclosion cage.

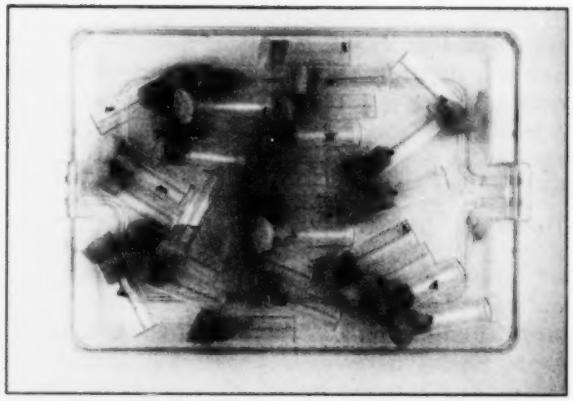

Figure 18. Shell vials, stoppered, containing *A. samarensis* flies.

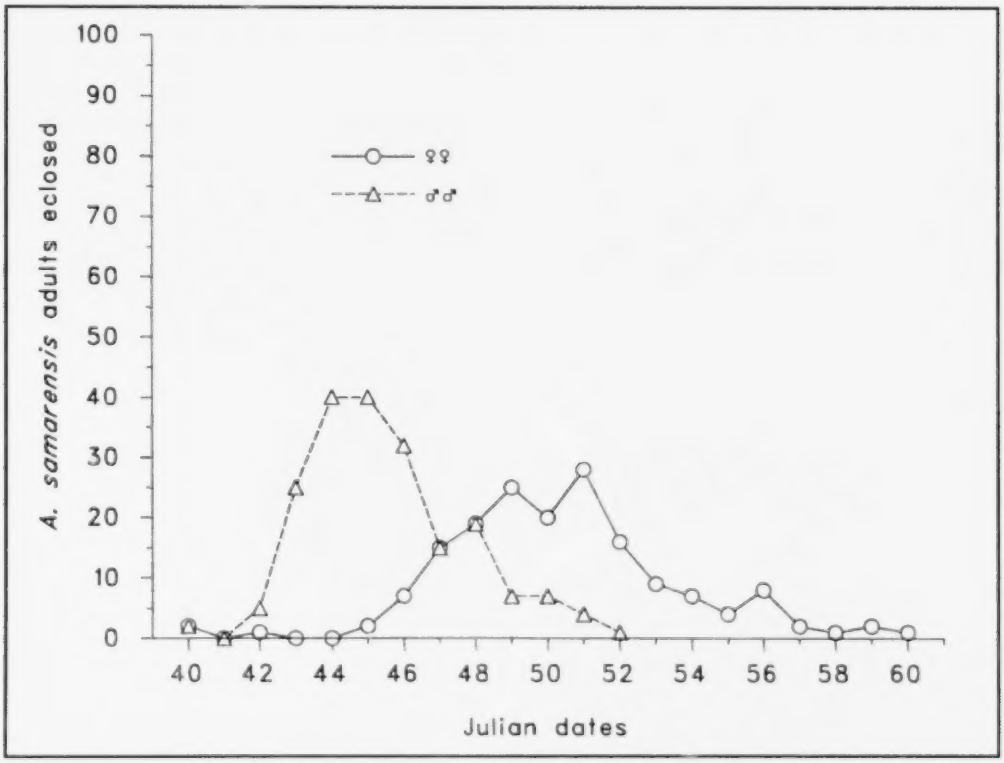

Figure 19. *A. samarensis*, eclosion pattern of 1119 post-hibernation (135-150 days at 2-4°C) puparia incubated at 15°C for 6 days and at 22°C thereafter.

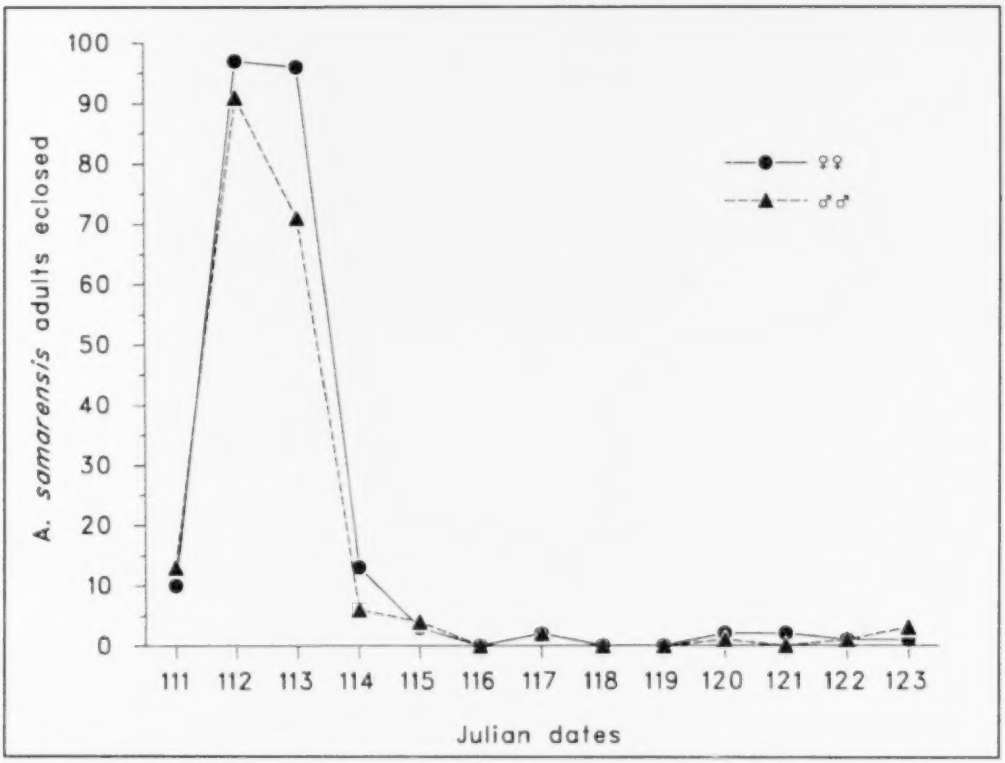

Figure 20. *A. samarensis*, eclosion pattern of 1074 non-hibernating, second-generation puparia at 25°C.

- Mating. Staggered age classes of males and females have to be available. Pairing of older (at least 3 days old) males with 1-4 (maximum 5) day old females is critical. Newly emerged females mate the most easily. Copulation lasts 2½-3 h. Mating success is 60-80% in the laboratory. The following steps should be taken using the arrangements shown in Figs. 13 and 22:

  - Mating cages are installed in front of a large window. The optimal light intensity for mating is from 20-100 (maximum 150) $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$ at cage level. Males ready to mate should swarm around in the cage. Mating is stimulated by varying cloudiness of the sky or a change in lighting in the laboratory in the order of 50 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$. When there is an overcast sky or continued rain, the insects are often inactive. Fanning warm air with a ventilated electric heater or carrying the cages from dark corridors to well-lit rooms helps to stimulate the flies. Honey-agar jelly should be available to the insects on the cage screening.

  - To begin the mating, introduce five virgin females into a cage with males, thereafter one female for each copulation observed. The more males in a cage, the greater the chances of copulation (Fig. 23).

- The pairs are gently removed from the cage on a cardboard strip (Fig. 24) and each pair placed in a plastic tube (Althor Products butyrate vials 2.5 x 7.5 cm with snugly fitting polyethylene cover), the bottom of which is perforated (Fig. 16, lower row, left). The tubes with the insects are held in a humid atmosphere, which is ensured by using a piece of window glass to cover a plastic basin filled with water (Fig. 25). During copulation the flies are almost motionless; termination of coitus is easily seen as the insects begin to walk around in the tube.

- After separation the flies are sexed and the males returned to their original cage. The mated females are placed into gestation cages (Fig. 14). For easy separation of the sexes, one of the tubes is unstoppered and another unstoppered empty tube is held against it with the open ends together; after one of the flies has walked into the second tube, both tubes are quickly restoppered and the insects are sexed.

- All manipulations must be done under a large tulle cover over wire hoops to recapture any escaped flies (Fig. 26). The rapidity with which the males and females are rotated will greatly enhance mating success.

- As the mating process is time consuming, this type of work should be started early in the day. Mating frequency reaches a peak in the early afternoon and copulations may continue until 10:00 PM. After no more copulations are observed, the mating cages (with a few unmated females) are placed at 15:10°C (12:12 h; day:night), 95% relative humidity and moderate 12:12 L:D lighting to increase longevity of the insects. Some pairs may not have separated by the close of the work day. They may be left in the humid chamber until morning, but a small droplet of honey-agar jelly should be put in the tube.

- There is a fatigue period for males; males that have mated often during the first day will do so less often on subsequent days.

- More than 5 day old females should be removed from the mating cage since their presence may reduce mating activity of the males.

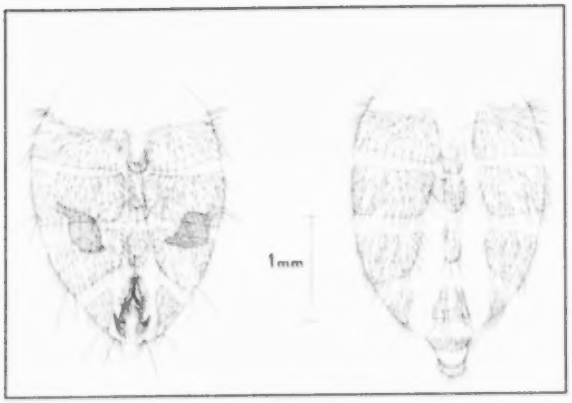

Figure 21. Ventral view of abdomen in *A. samarensis* to show genitalia. Left: male. Right: female.

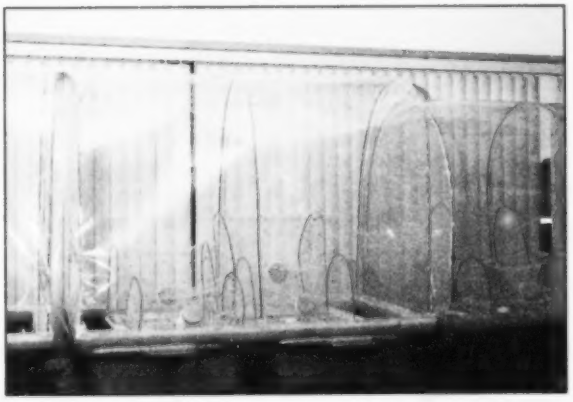

Figure 22. Mating cages installed over water basins with plastic coverings to retain high humidity.

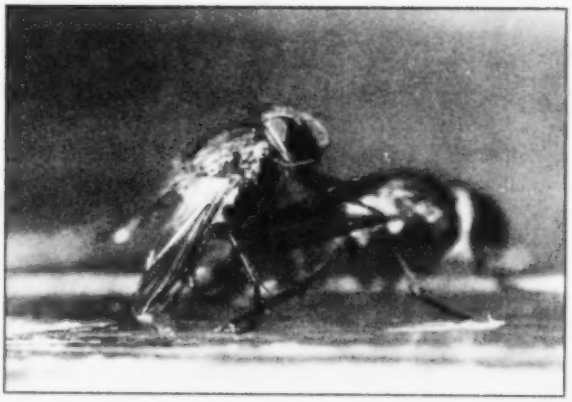

Figure 23. Copulation of *A. samarensis*.

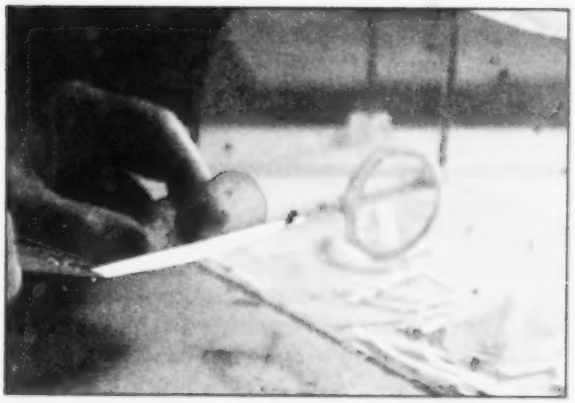

Figure 24. Removal of *A. samarensis* pair in copula from mating cage by means of a cardboard strip.

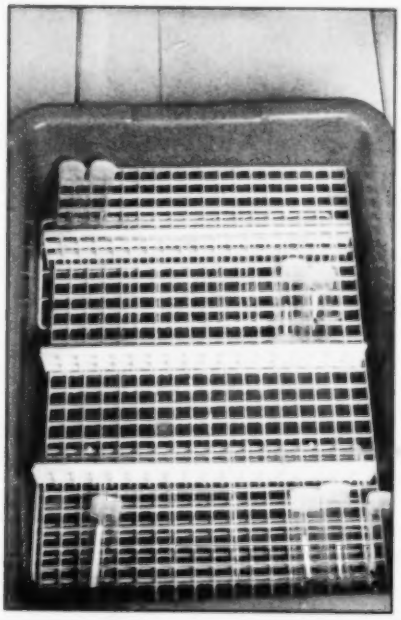

Figure 25. Water basin to accommodate flies from mating cages until the end of coitus in a humid atmosphere.

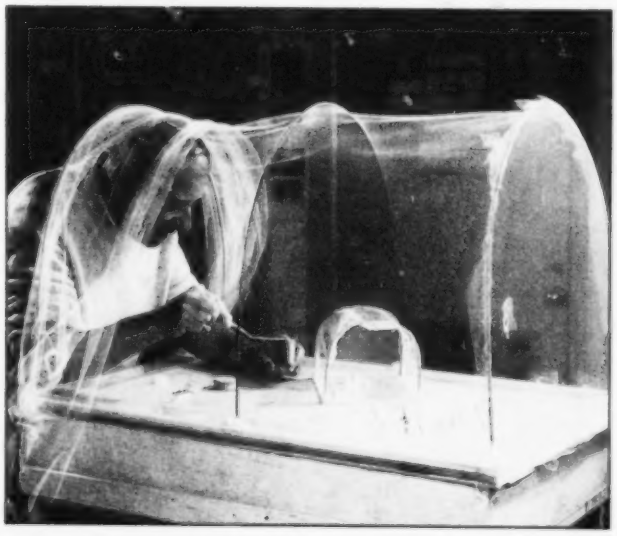

Figure 26. Large tulle cover over wire hoops to prevent flies from escaping.

- Gestation. For gestation, mated *A. samarensis* are held in groups of 20-40 in gestation cages (Fig. 14) with small oak plants. The larger cage model, 45 x 32 x 55 cm, can hold up to 100 flies. Honey-agar jelly is spread on top of the screening, and a container with water and a dental cotton wick is placed inside the cage. The cages must be replaced by new ones at least once a week for cleanliness and to ensure that the honey agar is not contaminated by microorganisms. Light must be low (dim light) to keep the flies quiet. Humidity of 95% should be maintained during this period. If humidified rearing rooms are not available, the same type of cover over water as used with the mating cages (Fig. 22) can be utilized. The cages are sprinkled with distilled water twice a day. Just before the end of the gestation period, about on the 10th day at 20:15°C (12:12 h; day:night) a few host larvae should be placed on the foliage. It is important that young flies ready to ovolarviposit are in contact with hosts as in nature, where perfect synchronization occurs. The gestation period can be lengthened to 17 days by placing the cages from 20:15°C to 15:10°C every second day. During gestation 10-50% mortality of the flies may occur. Some mechanical damage to individual flies seems inevitable if many flies are held in the same cage. Odell *et al.* (1979) report the death of 52% of *Blepharipa pratensis* (Meig.) before oviposition, due to bacterial infection. Therefore, the gestation cages must be scrupulously clean before use, preferably made of new materials or treated with ultraviolet rays after having been washed with 70% alcohol.

- Host exposure. At about the end of the gestation period, 1-2 *A. samarensis* females per host exposure cage are placed with 20-30 2nd-instar gypsy moth larvae on small oak trees (Fig. 14). It is important that the host larvae be of good quality and actively feeding on the foliage to stimulate attacks. To ensure that the gypsy moth larvae are attached to the foliage and do not fall to the cage bottom, they are first placed in Petri dishes and then directed, by means of a soft paint brush, towards foliage. All host exposure cages are numbered sequentially. Rotation of the gypsy moth larvae on foliage must be carefully planned. Host larvae to be exposed to the parasitoids can be prepared 1 day in advance, 20-30 larvae per Petri dish without food, and stored at 8°C. Exposure of hosts to the parasitoid is 2 or maximum 3 days with up to 100 cages rotated per day, depending on technical help. For the transfer of the flies, if they are undisturbed and sitting on the screening, the upper part of the cage is fitted over the newly prepared base with fresh plants and hosts. Alternatively, the flies can be captured singly using a small shell vial. The water basin with the wick is renewed with each transfer. Honey-agar jelly is reapplied. It is best to use new clean cage covers and replace the honey- agar jelly with each rotation. The old cage covers are dipped in hot water to remove the old jelly. Also the styrofoam bases must be wiped clean with 70% alcohol after each transfer of material. Spray the cage with distilled water after each transfer. In addition, all cages should be sprinkled with water twice a day.

  To avoid spraying the host exposure cages by hand, an irrigation system that disperses mists of water can be used. It consists of a central tube with solenoid valves and nozzles branching about every 90 cm. A solid-state precision timer with a 24-h cycle is set at 8-8-8 h or 12-12 h to mist the cages for 3-4 s each time. To ensure an even distribution of spray, the water pressure must be stable, the water free of deposits, and the nozzles properly cleaned (Fig. 15).

  For rearing *A. samarensis* on a large scale, it is possible to utilize up to five parasitoids per larger cage (45 x 32 x 55 cm) (Fig. 15). Fifty host larvae should then be exposed in each cage for a 2- or 3-day period. There is not much economy in space as compared to the small cages but labour is reduced considerably. Thermoperiod of 22:15°C (12:12 h; day:night), relative humidity of 95%, photoperiod of 12:12 h (L:D) and light intensity of 50 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$ is recommended. The cooler night temperature increases longevity of the flies and slows down feeding of the host larvae at night. To ensure exactly 95% relative humidity in the rearing room, humidifiers should be stopped by timers for certain hours periodically to avoid spilling water on floor and tables.

  Host larvae are collected and replaced with unparasitized ones until parasitoids are dead or can no longer fly. Plants can be used until completely defoliated.

- Rearing parasitized host larvae. Exposed gypsy moth larvae are collected from the plants using flat stainless steel forceps and placed with diet in 163 mL SOLO cups (Fig. 28, left). Thirty larvae, maximum, can be reared in each cup, representing the host exchange of one cage. The cups should bear the date of the collection from the host exposure cages and be held at 22°C for 2-3 days to speed up development without effect on diapause. This is necessary because otherwise the smaller larvae will later fall through the holes of the compound rearing unit (Fig. 10) and starve For

further rearing, if diapausing parasitoids are wanted, the cups must be transferred to a thermoperiod of 20:15°C (12:12 h; day:night), 50% relative humidity and 12:12 h (L:D) photoperiod. Otherwise, for continuous rearing, the temperature should be 22°C and photoperiod 18:6 h (L:D). About a week after ovolarviposition, before the mature fly maggots bore out of the host (Fig. 27), the gypsy moth larvae are transferred to the containers that ensure separation of the parasitoids from the caterpillars (Fig. 28, right). This is important because *A. samarensis* puparia may be damaged by the unparasitized hosts. In order to obtain large, healthy puparia, it is important that the parasitized gypsy moth larvae be well fed on diet until the parasitoids have bored out. When this transfer is made, the gypsy moth larvae should be freed of filaments, otherwise parasitoid larvae may become entangled in them.

The diet should be fresh and contamination-free. The application of the diet on the inner side of the cover affords a very economical use of the medium, it also prevents the diet from becoming contaminated with excrement. A larger supply of these covers should be kept ready in the refrigerator until needed.

- Collection of puparia. The compound rearing cups are examined every second day or at least twice a week. From the lower part of the container (styrofoam cup), any puparia and free maggots are collected and placed in separate dishes to avoid having the puparia disturbed by the wiggling fly larvae. After each examination, the old frass pellets must be discarded. The cover with the diet is replaced, if necessary. The diet must not cause obstruction of the bottom holes. Old 5th instar host larvae that are unlikely to be parasitized, and consume food unnecessarily, should be eliminated. Puparia may be found up to 21 days from the date marked on the cup, and the rearing unit can then be discarded.

- Handling of puparia and hibernation. Mature *A. samarensis* maggots become motionless within 3-4 h at 22°C and are still pale and soft. Pupariation is complete within 8-12 h. The hardened, brown puparia are washed with distilled water on a glass plate to remove adhering frass pellets and filaments. Godwin and Odell (1981) caution against unnecessary handling of puparia which caused 50-70% mortality in *B. pratensis* between pupariation and pupation. After cleaning and hardening, the puparia are spread on autoclaved, wet peat so that they do not touch each other (Fig. 29). The peat is placed 1 cm deep in the bottom part of a plastic Petri dish (Falcon Plastics, 150 x 25 mm). It is sufficiently wet if no more water is dripping from the dish. The puparia are then covered with another layer of wet peat for better protection against microorganisms. About 500 puparia can be placed in each plastic Petri dish. The Petri dish containing the puparia is placed over distilled water in a large plastic container with a tight-fitting cover, in which the dish is held on a modified rack for reagent tubes (Fig. 30). If the puparia are not covered by peat, which has antimicrobial properties, fungi (e.g. *Rhizopus* sp., *Pacilomyzus farinosus*) may develop on them. Also the cover of the water basin must be well closed to avoid contact of the material with the surrounding air, which often carries spores.

  If diapausing puparia are wanted for hibernation, the puparia are stored at 13.5°C with a 12:12 h (L:D) photoperiod at low light intensity to avoid unwanted eclosion of adults. After 30 days at this temperature, red eyes begin to show on the pupae inside the puparium. It takes 42 days to arrive at the pharate adult stage (Fig. 31). They are then transferred to 8-10°C for 10 days and thereafter stored at 2-4°C for hibernation up to 8 months. If the puparia are put too soon to 10°C, i.e. before the pharate adults are formed, the prepupal stage will not survive hibernation and eventually die. The puparia should therefore be held for 1-2 months at 13.5°C for prehibernation. After a minimum hibernation of 3 months, puparia can be removed from cold storage and incubated, first at 15°C for 5 days and then in an eclosion cage at 22-25°C.

  For continuous rearing of the fly, diapause is prevented if puparia, once formed, are held at 20-25°C for pupation and eclosion. Any exposure of newly formed puparia to 15°C for 1 week or longer will induce diapause, in at least part of the material.

- Cleaning procedures. All equipment and cages must be scrupulously clean. Incubators and plant growth rooms must be washed on the walls and tables with Sporicidin disinfectant (Sporicidin International, Rockville, MD, USA; distributor in Canada: Canadawide Scientific Ltd., Ottawa) prior to use. Tulle cages are rinsed with hot tap water to remove the old honey-agar jelly, thoroughly wetted with 70% ethanol and let dry before the next use. Tulle covers that show mouldy spots must be replaced. Smaller tulle cages can be disinfected by exposure to ultraviolet light in a "Steril Gard" hood (Scientific Products ESBE, Ville Saint-Laurent, QC) for 20 min. For contamination-free storage, tulle cages can be deposited in large plastic bags that are hermetically sealed. All glassware (vials and petri dishes) and tubes for mating must be washed thoroughly in Sparkleen (Fisherbrand) solution. The cheaper

containers (SOLO cups and styrofoam drinking cups) should be discarded after use. For Eraware containers, immersion for 24 h in diluted hypochlorite solution (2% of commercial bleach) and subsequent drying is recommended. The unused gypsy moth larvae and old diet are autoclaved in Fisherbrand autoclave bags. To rapidly kill the insects, use cold rooms set at -15°C. The large old caterpillars from the compound rearing cups can be drowned in 50% alcohol. Foam plastic stoppers should be replaced when mouldy spots appear on them. Table surfaces and interior walls of rearing rooms should be washed frequently with Sporicidin disinfectant solution or with 70% ethanol.

- Parasitoid production. Under mass-rearing conditions, the average fecundity of an *A. samarensis* female is about 30 puparia produced per lifespan, although it may be 50 puparia per female, on the average, if the rearings are carried out very painstakingly with less material (Quednau 1993). As an example, the yield of puparia with 2-day interval collections in a post-hibernation rearing in 1996 is presented in Fig. 32. In the 100 cages used, there was a 14-day difference between the first and the last cages prepared for host exposures, because not all *A. samarensis* females had terminated gestation at the same time. There was a distinct peak in the number of puparia collected after the tenth day counted from when the first puparia were found, reflecting the synovigenic progeny disposal of the fly (Quednau 1993). The maximum number of puparia obtained during a single 2-day interval was 500, the total number of puparia produced 4597. In a more recent similar rearing, 6223 puparia were obtained.

Table 1 shows the production of *A. samarensis* at the Laurentian Forestry Centre in 1996 and their utilization. Table 2 gives the principal mortalities observed during incubation of puparia in post-hibernation and second-generation rearings. Considerable mortality by factors difficult to control occurs during the propagation of the flies and some of them are listed in Table 3. Recently *Leptomonas* sp. (Trypanosomidae) was found in puparia containing prepupae that would not transform into pharate adults and eventually decompose.

Carl and Kenis (1990) report 85-96% eclosion of *A. samarensis* puparia when field-collected, parasitized gypsy moth larvae were reared in the laboratory at 26°C and 18:6 h (L:D) photoperiod in Europe. Avoiding the diapause occurred when these conditions acted primarily between pupariation and pupation. It was not possible to obtain the same high eclosion rate at the Laurentian Forestry Centre. Also the exact environmental conditions for the hosts attacked in the field in Europe are not known and are likely to be different from those used in the laboratory in Canada.

Losses in the fly rearings can be counter-balanced by obtaining a high percentage of mating and excellent survival of flies during gestation and ovolarviposition.

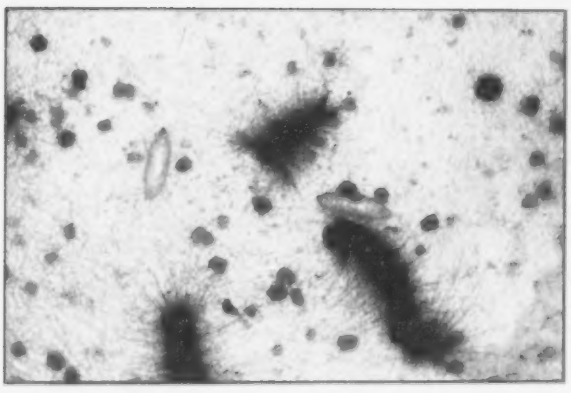

Figure 27. Mature *A. samarensis* maggots that have bored out of their hosts.

Figure 28. Rearing cups with parasitized gypsy moth larvae. Left: simple cup (type 2) with diet at the bottom. Right: compound cup (type 3) with diet on the cover.

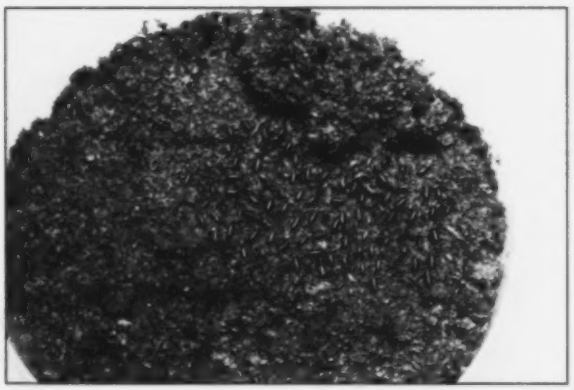

Figure 29. Puparia of *A. samarensis* on autoclaved peat in Petri dish.

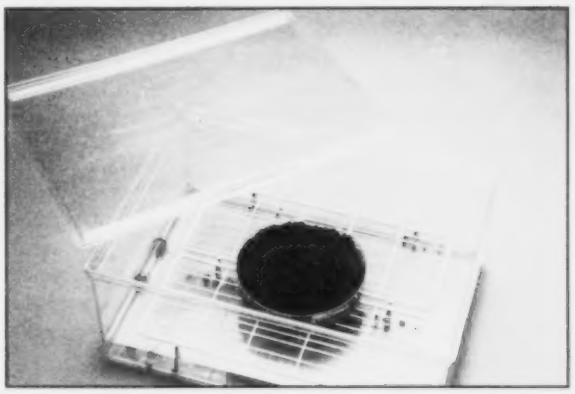

Figure 30. Plastic container to hold puparia of *A. samarensis* in a Petri dish with peat in water-saturated atmosphere for hibernation.

Figure 31. Pharate adult of *A. samarensis* taken out of its puparium.

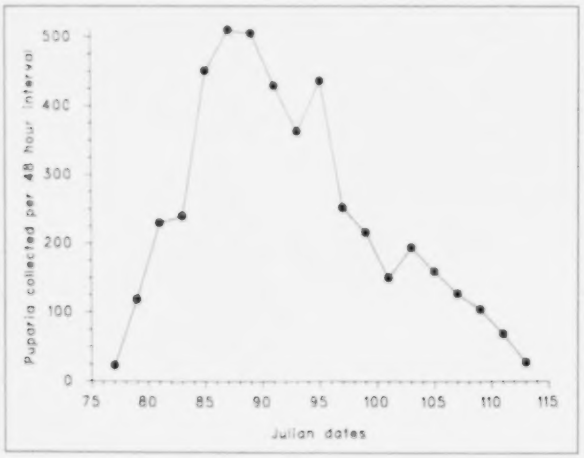

Figure 32. *A. samarensis*, yield of a second-generation rearing in 100 host exposure cages (two parasitoids per cage, rotation of 30 host larvae per cage every 3 days). Total yield: 4597 puparia.

REARING OPERATIONS

The different operational steps in rearing *A. samarensis* are summarized in Fig. 33, and the ambient conditions (temperature, humidity and light) required for each phase of the operation are listed. As in nature, the perfect synchronization of host plants, gypsy moth larvae and gestated (gravid) parasitoids is the key to the success of the whole rearing. Proper timing and planning the different operational steps is therefore imperative.

To help you to develop a plan for the implementation of the rearing, especially with a view to field releases, a timetable is presented in Fig. 34. One complete generation turnover for a larger cohort (about 200 gravid females) in a 22:15°C (12:12 h; day:night) thermoperiod will take 2½ months. It takes only 1½ months at 22°C with a 18:6 h (day:night) photoperiod.

FACILITIES

The following are different types of rooms needed for the efficient rearing of *A. samarensis*:

Room No. 1. Humidified. Fluorescent lighting. Thermoperiod: 20:15°C (12:12 h; day:night). Hold males after eclosion. Expose host insects in exposure cages to parasitoids.

Room No. 2. Humidified. Fluorescent lighting (dim light). Thermoperiod: 20:15°C (12:12 h; day:night). Hold mated females during gestation.

Room No. 3. Humidified. Weak fluorescent lighting. Thermoperiod: 15:10°C (12:12 h; day:night). Hold males that have already copulated.

Room No. 4. Not humidified. Fluorescent lighting. Thermoperiod: 20:15°C (12:12 h; day:night). Hold rearing cups (both types) with parasitized host larvae, if diapausing puparia are needed.

Room No. 5. Not humidified. 22-25°C. Fluorescent lighting. Use for eclosion cages and for containers holding parasitized host larvae in accelerated operation.

Incubator. 25°C, not humidified. Darkness. Incubate gypsy moth egg masses.

Incubator. 15°C, humidified. Fluorescent lighting (18:6 h; day:night). Hold puparia temporarily for second-generation rearing.

Incubator. 13.5°C, humidified. Fluorescent lighting (12:12 h; day:night). Hold puparia prior to hibernation.

Cold room. (2°C, humidified). Darkness. Hold hibernating fly puparia and oak seeds.

Cold room. (7°C, humidified). Fluorescent lighting. Hold small oak trees with tender foliage. Hold gypsy moth egg masses.

Cold room. (7°C, not humidified). Fluorescent lighting. Hold 2nd-instar gypsy moth larvae on diet.

Greenhouse.

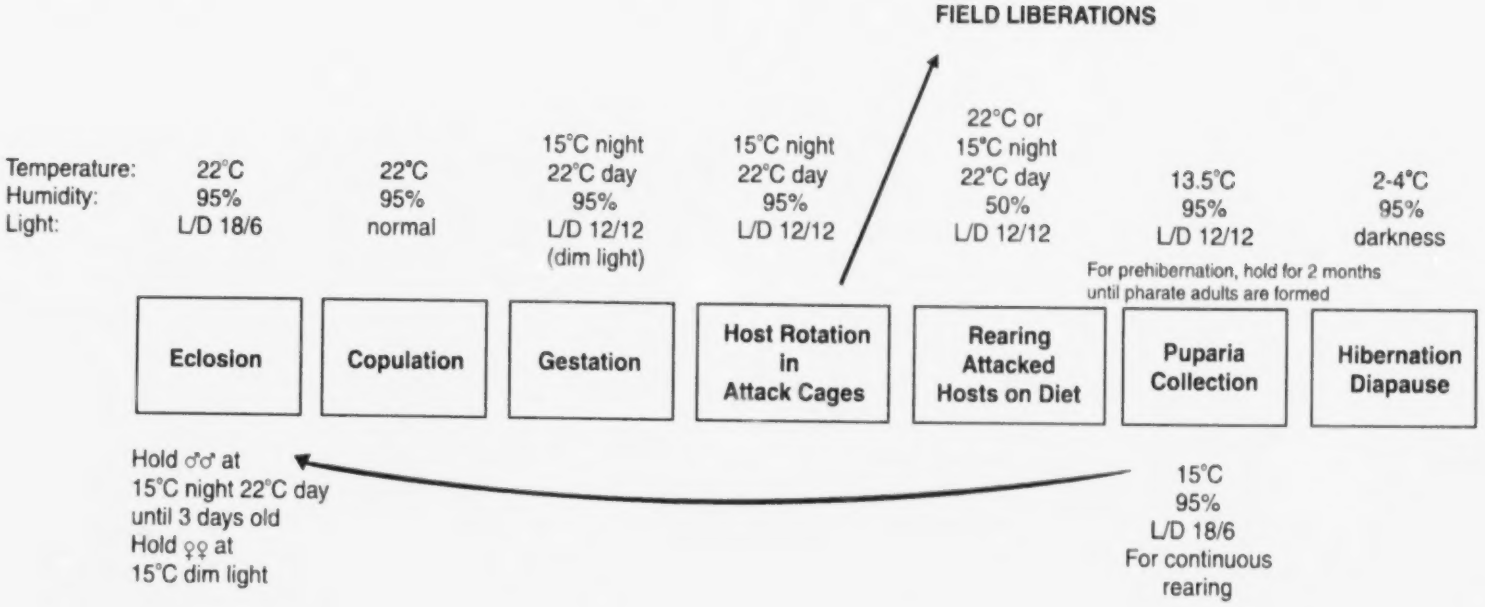

Figure 33. *A. samarensis* rearing operations and abiotic environmental requirements.

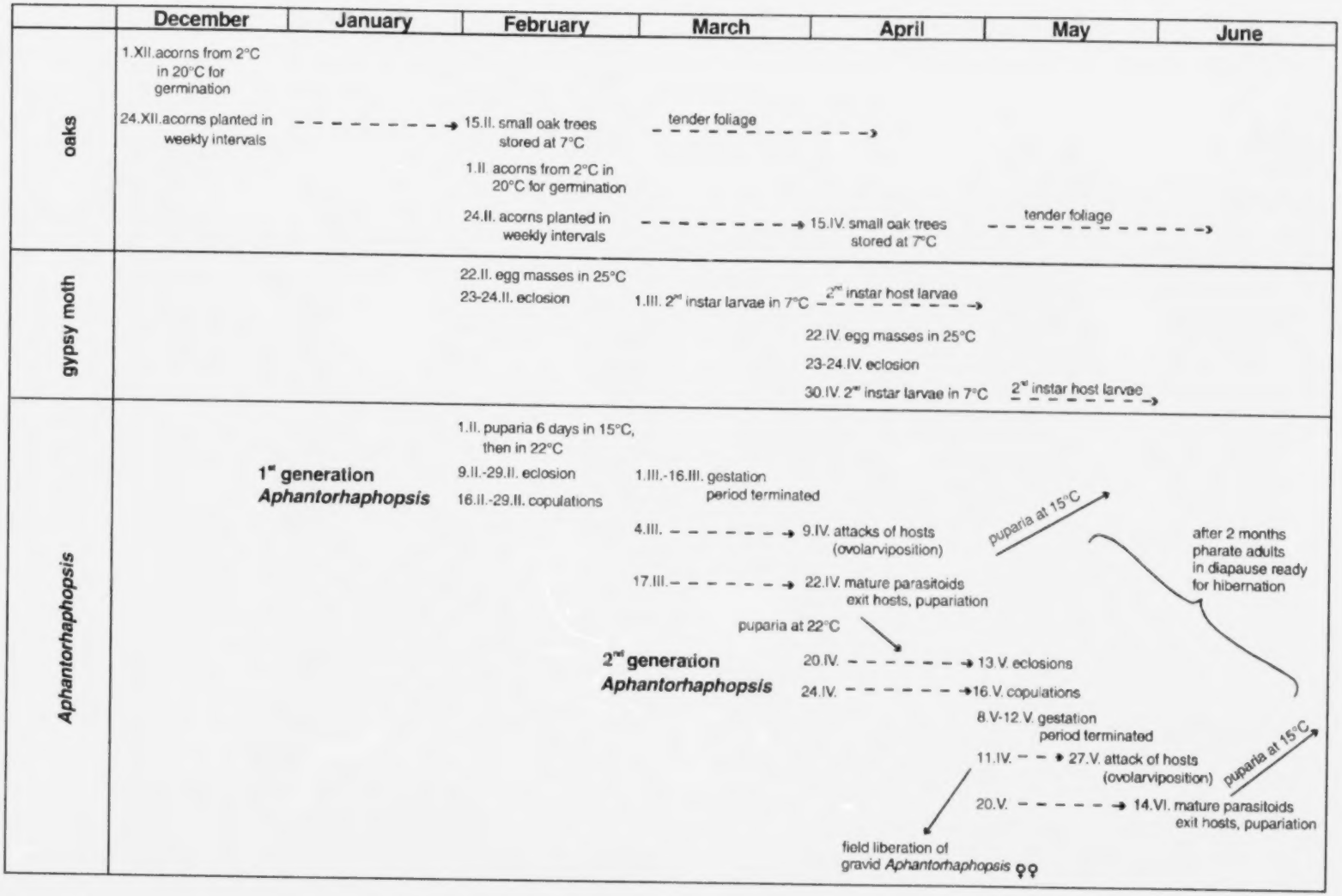

Figure 34. Timetable for events during *A. samarensis* rearing in the laboratory.

Table 1. *A. samarensis* rearings in 1996.

Rearing after hibernation (puparia 5 months at 2°C)	**Rearing 2nd generation** (puparia 1 month or less at 15°C)		**Rearing 3rd generation** (puparia 12 days or less at 15°C)	
1700 puparia	4587 puparia		2000 puparia	
↓	↓		↓	
707 eclosions (41%) at 22°C	2485 eclosions (55%) at 25°C		951 eclosions (48%) at 25°C	
↓	↓		↓	
275 copulations (80%)	1063 copulations (83%)		401 copulations (85%)	
↓	↓		↓	
survived 200 ♀♀ after gestation (70%)	survived 500 ♀♀ after gestation (47%)		survived 182 ♀♀ after gestation (45%)	
↓	↙	↘	↙	↘
4587 puparia	2030 puparia	200 ♀♀ liberated	132 ♀♀ retained	50 ♀♀ to USDA
			↙	↘
			500 puparia retained	1000 puparia to USDA

Table 2. Mortality of *A. samarensis* puparia.

Pharate adults not eclosed	Killed by fungi	Dead during eclosion	Pupae not formed	Empty puparia (decomposed)	Healthy, eclosed flies	Total number of puparia examined
			Post-hibernation rearing in 1996[1]			
274 (15%)	551	16	88	74	707 (41%)	1714
			Second-generation rearing in 1995[2]			
150 (11%)	42	25	181	0	945 (70%)	1343
			Second-generation rearing in 1996[2]			
120 (8%)	42	48	274	83	861 (60%)	1428

[1] Hibernation at 2°C was 5 months. Diapause apparently not terminated in 15% of individuals.
[2] Puparia held at 15°C for 2-3 weeks prior to incubation. Diapause induced in 8-11% of individuals.

Table 3. Principal mortalities in *A. samarensis* rearings.

Event	% mortality	Reason
Post-hibernation puparia (before eclosion)	50-60	Fungi, pharate adults fail to eclose
Non-hibernating puparia (before eclosion)	25-40	Pathogens, pupae not formed inside puparium, pharate adults fail to eclose
Females during gestation	10-50	Bacteria, starvation
Ovolarvipositing (gravid) females	20-50	Weakness, wing damage

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Gary Bernon, USDA, Otis Methods Development Center, MA, USA, for regularly supplying us with gypsy moth egg masses, and also Ms. Deborah Winograd of the same institute for reviewing the text. Claude Thireau and Roger Gagné made significant improvements to the rearings. Drs. V.G. Nealis, Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, Victoria, BC, and Vicente Sánchez, USDA Forest Service, Hamden, CT, USA, made helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

Andersen, S. 1983. Phylogeny and classification of Old World genera of Siphonini (Diptera: Tachinidae). Entomol. Scand. 14:1-15.

Andersen, S. 1996. The Siphonini (Diptera: Tachinidae) of Europe. Fauna Entomol. Scand. 33, 148 pp.

Bell, A.R.; Owens, C.D.; Shapiro, M.; Tardif, J.R. 1981. Development of mass-rearing technology. *In* The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management. *Edited by* C.C. Doane and M.L. McManus. U.S. Dep. Agric., For. Serv., Tech. Bull. 1584. Washington, D.C. pp. 599-619.

Bonner, F.W. 1992. Collection and care of acorns. *In* Oak Regeneration: Serious Problems, Practical Recommendations. Symposium Proc. Sept. 8-10, 1992. Knoxville, Tennessee. *Edited by* D.L. Loftis and C.E. McGee. U.S. Dep. Agric., For. Serv., Southeastern For. Exp. Stn., Asheville, N.C. Gen. Tech. Rep. SE-84. pp. 290-297.

Carl, K.P.; Kenis, M. 1990. Annual Project Report for 1990. C.A.B. International Institute of Biological Control, European Station.

Godwin, P.A.; Odell, T.M. 1981. *Blepharipa pratensis* (Meigen) (Diptera: Tachinidae). *In* The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management. *Edited by* C.C. Doane and M.L. McManus. U.S. Dep. Agric., For. Serv., Tech. Bull. 1584. Washington, D.C. pp. 375-394.

Mills, N.J.; Carl, K.P.; Kenis, M. 1989. Annual Project Report for 1989. C.A.B. International Institute of Biological Control, European Station.

Mills, N.J.; Fischer, P.; Glanz, W.-D. 1986. Host exposure: a technique for the study of gypsy moth larval parasitoids under non-outbreak conditions. Proc. 18th IUFRO World Congress, Division 2, 2:777-785.

Mills, N.J.; Nealis, V.G. 1992. European field collections and Canadian releases of *Ceranthia samarensis* (Dipt.: Tachinidae), a parasitoid of the gypsy moth. Entomophaga 37:181-191.

Nealis, V.G.; Quednau, F.W. 1996. Canadian field releases and overwinter survival of *Ceranthia samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae), for biological control of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). (Lepidoptera: Lymantriidae). Proc. Entomol. Soc. Ont. 127:11-20.

Odell, T.M.; Butt, C.A.; Bridgeforth, A.W. 1985. *Lymantria dispar*. *In* Handbook of Insect Rearing, Vol. 2. *Edited by* P. Singh and R.F. Moore. Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam. pp. 355-367.

Odell, T.M.; Godwin, P.A. 1979. Laboratory techniques for rearing *Blepharipa pratensis*, a tachinid parasite of gypsy moth. Ann. Entomol. Soc. Am. 72:632-635.

O'Hara, J.E. 1989. Systematics of the genus group taxa of the Siphonini (Diptera: Tachinidae). Quaest. Entomol. 25:1-229.

O'Hara, J.E. 1998. What's in a name? *Ceranthia samarensis* vs. *Aphantorhaphopsis samarensis*. The Tachinid Times 11:2-4.

Quednau, F.W. 1993. Reproductive biology and laboratory rearing of *Ceranthia samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). Can. Entomol. 125:749-759.

LES RESSOURCES NATURELLES DU CANADA
POUR AUJOURD'HUI ET POUR DEMAIN
www.rncan.gc.ca

Méthodes d'élevage de masse pour la mouche *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve), (Diptera : Tachinidae : Siphoninae), un parasitoïde de la spongieuse

F. Wolfgang Quednau et Karl Lamontagne

Centre de foresterie des Laurentides
Rapport d'information LAU-X-121F
(version révisée 2003)

Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts
Natural Resources Canada
Canadian Forest Service

Canada

Méthodes d'élevage de masse pour la mouche *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera : Tachinidae : Siphoninae), un parasitoïde de la spongieuse

F. Wolfgang Quednau et Karl Lamontagne

Rapport d'information LAU-X-121F
(version révisée 2003)

Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Laurentides
Sainte-Foy (Québec)

DONNÉES DE CATALOGAGE AVANT PUBLICATION (CANADA)

Quednau, F.W.

Méthodes d'élevage de masse pour la mouche *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera : Tachinidae : Siphoninae)

(Rapport d'information; LAU-X-121F)
Publ. aussi en anglais sous le titre : Principles of mass culture of the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve)
ISBN 0-662-86265-1
No de cat. Fo46-18/121-2003F

1. *Aphantorhaphopsis samarensis* -- Élevage -- Québec (Province) -- Sainte-Foy.
2. Spongieuse, Lutte biologique contre la -- Amérique du Nord.
3. Insectes forestiers, Lutte biologique contre les – Amérique du Nord.
I. Lamontagne, Karl.
II. Centre de foresterie des Laurentides.
III. Titre.
IV. Coll.: Rapport d'information (Centre de foresterie des Laurentides); LAU-X-121F.

SB945.G9Q83 1998 634.9'6774 C98-980258-2

© Sa Majesté la Reine du Chef du Canada 2003
Numéro de catalogue Fo46-18/121-2003F
ISBN 0-662-86265-1
ISSN 0835-1589

Il est possible d'obtenir sans frais un nombre restreint d'exemplaires en français de cette publication auprès de :
Ressources naturelles Canada
Service canadien des forêts
Centre de foresterie des Laurentides
1055, rue du P.E.P.S., C.P. 3800
Sainte-Foy (Québec)
Canada G1V 4C7
Site Web du CFL :http://www.cfl.scf.rncan.gc.ca

Des copies ou des microfiches de cette publication sont en vente chez :
Micromédia Ltée
240, rue Catherine, bureau 305
Ottawa (Ontario) K2P 2G8
Tél. : (613) 237-4250
Ligne sans frais : 1-800-567-1914
Téléc. : (613) 237-4251

This publication is also available in English under the title "Principles of mass culture of the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae: Siphoninae)" (Catalog No. Fo46-18/121-2003E).

TABLE DES MATIÈRES

Page

ABSTRACT vii

RÉSUMÉ vii

INTRODUCTION 1

MÉTHODES D'ÉLEVAGE 1
- La plante-hôte 2
- L'insecte-hôte 4
- Le parasitoïde 6

ÉTAPES OPÉRATIONNELLES DE L'ÉLEVAGE 23

INSTALLATIONS 23

REMERCIEMENTS 28

RÉFÉRENCES 28

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Élevage de l'*A. samarensis* en 1996 26

Tableau 2. Cause de mortalité chez les puparíums de l'*A. samarensis* 27

Tableau 3. Principales causes de mortalité observées durant l'élevage de l'*A. samarensis* 27

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma conceptuel de l'interaction entre l'hôte et le parasitoïde 3

Figure 2. Glands germés de chêne rouge (*Quercus rubra*) 3

Figure 3. Bassin en plastique et treillis métallique supportant les gobelets contenant les semis de chêne 3

Figure 4. Espace de bureau équipé d'un système d'éclairage pour la culture des semis de chêne 3

Figure 5. Masses d'oeufs de spongieuse (*Lymantria dispar*) pondues sur du papier 5

Figure 6. Masses d'oeufs de spongieuse immergées dans une solution de formaldéhyde 5

Figure 7. Système d'échange rapide de l'eau utilisé pour le rinçage des masses d'oeufs 5

Figure 8. Contenant en plastique (type 1) permettant d'élever sur diète artificielle un grand nombre de chenilles de spongieuse 7

Figure 9. Contenants SOLO dans l'incubateur, utilisés pour l'élevage sur diète artificielle des chenilles de spongieuse exposées à l'*A. samarensis* 7

Figure 10. Parties d'un contenant d'élevage composé (type 3) utilisé pour séparer les larves matures du parasitoïde des chenilles non parasitées 7

Figure 11. Cycle de vie de l'*A. samarensis* en laboratoire 8

Figure 12. Cage d'émergence 9

Figure 13. Cages de confinement des parasitoïdes mâles et femelles après l'émergence et durant l'accouplement 9

Figure 14. Cage de gestation et d'exposition au parasitoïde 10

Figure 15. Grandes cages d'exposition dans la salle d'élevage équipée d'un système de pulvérisation automatique 10

Figure 16. Matériel utilisé pour l'alimentation et la récupération des *A. samarensis* adultes 12

Figure 17. Puparíums sur de la mousse de tourbe dans une cage d'émergence 12

Figure 18. Flacons fermés contenant des parasitoïdes adultes 12

Figure 19. *A. samarensis* : émergence de 1 119 puparíums post-hibernants 13

Figure 20. *A. samarensis* : émergence de 1 074 puparíums non hibernants de la deuxième génération ... 14

Figure 21. Vue ventrale de l'abdomen de l'*A. samarensis* montrant les structures génitales 16

Figure 22. Cages d'accouplement installées au-dessus de bacs d'eau et recouvertes d'une housse en plastique pour maintenir un taux d'humidité élevé 16

Figure 23. Accouplement chez l'*A. samarensis* 16

Figure 24. Récupération à l'aide d'une bandelette de carton d'un couple *in copula* d'*A. samarensis* venant d'une cage d'accouplement 16

Figure 25. Bac d'eau permettant de garder dans une humidité élevée les mouches qui viennent d'une cage d'accouplement jusqu'à la fin du coït 17

Figure 26. Grande housse de tulle tendue sur des arceaux de métal empêchant la fuite des parasitoïdes 17

Figure 27. Larves matures de l'*A. samarensis* récemment sorties de leurs hôtes 21

Figure 28. Contenants d'élevage renfermant des chenilles de spongieuse parasitées 21

Figure 29. Puparíums d'*A. samarensis* sur de la mousse de tourbe autoclavée, dans une boîte de Petri 21

Figure 30. Contenant en plastique pour le dépôt des puparíums du parasitoïde sur la mousse de tourbe dans une boîte de Petri. Un couvercle hermétique est placé pour conserver une atmosphère saturée d'eau durant l'hibernation 21

Figure 31. Adulte pharate d'*A. samarensis* extrait de son puparium 22

Figure 32. *A. samarensis*, puparíums récoltés durant l'élevage d'une deuxième génération avec 100 cages d'exposition 22

Figure 33. Étapes de l'élevage de l'*A. samarensis* et exigences environnementales abiotiques 24

Figure 34. Calendrier des principales étapes de l'élevage de l'*A. samarensis* en laboratoire 25

Quednau, F.W.; Lamontagne, K. 2002. Principles of mass culture of the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae: Siphoninae). Nat. Resour. Can., Can. For. Serv., Laurentian For. Cent., Sainte-Foy, Que. Inf. Rep. LAU-X-121 (revised version).

ABSTRACT

Techniques for rearing the gypsy moth parasitoid *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) are described. The biological characteristics of the host plant, the host insect, and the parasitoid are outlined and data on productivity are presented. The necessary working equipment and facilities are illustrated.

Quednau, F.W.; Lamontagne, K. 2002. Méthodes d'élevage de masse pour la mouche *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae: Siphoninae), un parasitoïde de la spongieuse. Ressour. nat. Can., Serv. can. for., Cent. for. Laurentides, Sainte-Foy, Qc. Rapp. inf. LAU-X-121F (version révisée).

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent des techniques d'élevage de masse applicables au parasitoïde *Aphantorhaphopsis samarensis* (Villeneuve) et présentent les caractéristiques biologiques de la plante-hôte, de l'insecte-hôte et du parasitoïde, ainsi que des données sur la productivité. Des illustrations du matériel et des installations d'élevage sont fournies.

INTRODUCTION

Un programme de recherche dans le domaine de la lutte biologique réalisé conjointement par l'International Institute of Biological Control et le Service canadien des forêts a conduit à la découverte et à l'importation de l'*Aphanthorhaphopsis samarensis*[1] (Diptera : Tachinidae), parasitoïde de la spongieuse. Ce parasitoïde est essentiellement univoltin en nature et présente une association pratiquement spécifique vis-à-vis de la spongieuse, deux caractéristiques recherchées chez un agent de lutte biologique. En Europe centrale, l'insecte se rencontre en association avec des populations de faible densité de la spongieuse, et on lui attribue un rôle important dans le maintien des populations du ravageur à des niveaux de densité relativement faibles et même dans la prévention d'infestations (Mills et collab., 1986, 1989; Mills et Nealis, 1992). Après avoir été attaquée par l'*A. samarensis*, la larve de la spongieuse meurt sur un jeune stade avant qu'une défoliation majeure ne se produise sur le terrain.

Comme l'*A. samarensis* vit en association avec de faibles populations de la spongieuse, il est difficile d'obtenir suffisamment de parasitoïdes à partir du matériel récolté sur le terrain pour procéder à des lâchers directs. En 1989, on a établi une colonie du parasitoïde au Centre de foresterie des Laurentides du Service canadien des forêts, à Sainte-Foy (Québec), afin de cerner les exigences biologiques de l'espèce, en vue de procéder à un élevage de masse (Quednau, 1993) et de fournir le matériel nécessaire aux premiers lâchers sur le terrain (Nealis et Quednau, 1996). Depuis 1991, on a produit des milliers de puparium et l'on a introduit dans la colonie des sujets de souches sauvages européennes afin de rehausser la qualité génétique de l'élevage. Le présent document décrit de façon plus approfondie les méthodes permettant d'élever cet insecte bénéfique en vue de l'utiliser contre la spongieuse en Amérique du Nord dans le cadre d'une nouvelle approche de lutte biologique.

L'*A. samarensis* est difficile à élever en captivité. Les méthodes d'élevage proposées à ce jour sont à la fois complexes et fastidieuses. Les améliorations critiques qui ont été apportées dans notre laboratoire et décrites en détail dans le présent article sont les suivantes :

- Reproduction des stimuli naturels de recherche de l'hôte. Des chenilles de spongieuse des deuxième et troisième stades sont exposées au parasitoïde pendant qu'elles s'alimentent sur des feuilles tendres de chêne.

- Approvisionnement continu en plantes-hôtes. Les semis obtenus à partir de glands sont exposés, une fois qu'ils ont produit leur feuillage tendre, à une température de 7 °C pendant une période maximale de 2 mois.

- Approvisionnement continu en chenilles. Des masses d'oeufs de spongieuse sont mises à incuber sur un milieu nutritif artificiel. Une fois qu'elles ont atteint le deuxième stade, les chenilles issues de ces oeufs sont exposées pendant une période maximale de 40 jours à une température de 7 °C. Durant cette période, les chenilles s'alimentent très peu.

- Remplacement rapide des insectes-hôtes. Un nouveau type de cage munie d'un plancher amovible permet de remplacer rapidement les insectes-hôtes.

- Isolement des larves libres du parasitoïde des chenilles non parasitées. Un nouveau type de contenant d'élevage permet d'isoler les larves libres matures du parasitoïde des chenilles non parasitées.

- Manipulation de la réponse facultative à la diapause. Il est possible de prévenir l'induction de la diapause chez l'*A. samarensis* en exposant les puparium à une température de 20 à 25 °C. Pour induire la diapause chez les puparium en vue de l'hibernation, il faut maintenir une différence entre les températures diurne et nocturne dans les salles d'élevage. Les puparium qui viennent de se former sont exposés à une température de 13,5 °C pendant 1 à 2 mois, jusqu'à la formation des adultes pharates, et à des températures plus basses par la suite.

MÉTHODES D'ÉLEVAGE

La réussite de l'interaction entre le parasitoïde et son hôte au moment où les deux insectes sont mis en présence l'un de l'autre dépend essentiellement de trois facteurs, soit la qualité des plantes sur lesquelles les insectes-hôtes s'alimentent, l'âge (stades larvaires) des chenilles et l'état reproducteur du parasitoïde ovolarvipare (figure 1).

[1] Autrefois connu sous le nom de *Ceranthia samarensis*. Comme le mentionnent Anderson (1983, 1996) et O'Hara (1989, 1998), le genre *Ceranthia* a été détaché à titre de taxon monophylétique d'un groupe plus vaste qui comprend le genre *Aphantorhaphopsis* Townsend, 1926, ensemble hétérogène (polyphylétique) renfermant l'espèce *samarensis*, initialement décrite sous le nom d'*Actia samarensis* Villeneuve, 1921.

La plante-hôte

Le chêne rouge (*Quercus rubra* L.) est l'espèce qui convient le mieux parce qu'elle produit de grandes feuilles tendres. Le chêne pédonculé (*Q. robur* L.) constitue également un bon choix, quoique son feuillage devient coriace plus rapidement. Pour produire suffisamment de semis pour l'élevage, il faut récolter une grande quantité de glands mûrs à l'automne (jusqu'à 20 000 glands, soit dix seaux de 20 L, pour un élevage d'un an), en recherchant les milieux où croissent de vieux chênes sains particulièrement généreux de leurs glands. Il est important de sélectionner des glands sains. Ces derniers calent au fond du contenant dans lequel ils sont immergés dans l'eau pendant 24 h. Les glands sont ensuite mis à sécher quelques jours sur du papier journal, à la température de la pièce. Durant cette période, des larves de charançons (Curculionidae) peuvent émerger des glands infestés.

Aux fins de la stratification, les glands sont transférés dans des contenants d'entreposage et exposés à des températures de 2 à 4 °C et à une humidité relative de 95 %. Les contenants doivent favoriser un bon échange de gaz avec l'atmosphère, mais les glands doivent rester humides. Des sacs en polyéthylène (45 x 100 cm) d'une épaisseur maximale de 0,006 mm (0,004 po) sont recommandés (Bonner, 1992). L'épaisseur des sacs est importante pour assurer une bonne aération et éliminer le CO_2 produit par les glands durant la stratification. Les glands peuvent être conservés dans ces conditions pendant au moins 9 mois. L'hibernation doit durer au moins 2 mois. En cas d'entreposage prolongé (un an ou plus), les taux de germination peuvent être réduits. Bonner (1992) mentionne toutefois que la réduction du taux de germination n'est pas critique si l'entreposage ne se prolonge pas sur plus de 3 ans.

Pour la germination, les glands sont ramenés à la température de la pièce (20 à 22 °C) dans une serre et placés dans un volume égal de PRO-MIX humide. Le contenant de germination doit être enveloppé d'un sac en plastique noir de manière à prévenir l'exposition des glands à la lumière et à maintenir un taux d'humidité adéquat. Selon la durée de la période d'entreposage au froid, les premières racines peuvent apparaître 2 semaines à 2 mois après le début de la période de germination (figure 2). Les glands sont plantés dans des gobelets en mousse de polystyrène [7 cm de diamètre (partie supérieure), 9 cm de hauteur], horizontalement, à 2 cm sous la surface du sol, les racines pointant vers le bas. Quatre trous doivent être forés dans le fond des verres avant la plantation. La composition du sol utilisé est la suivante : terre noire (2,5 parties), PRO-MIX (2 parties) et mousse de tourbe (0,5 partie). Le sol ne doit être ni trop lourd ni trop léger. Il faut arroser les semis au moins deux fois par semaine, en veillant à ne jamais laisser le sol s'assécher entre les arrosages. Pour maintenir un taux d'humidité adéquat autour des racines, les verres contenant les glands germés sont déposés sur un treillis métallique tendu sur un cadre en bois installé à 2 cm du fond d'un bac en plastique de 50 x 38 x 12 cm (Rubbermaid Canada). Le fond du bac est rempli d'eau jusqu'au treillis (figure 3). Chaque bac peut recevoir une trentaine de gobelets. Les racines finissent par sortir par les orifices pratiqués au fond des gobelets. Le pourcentage de pertes après la plantation peut s'élever à 40 %. Les glands germés excédentaires dans le PRO-MIX humide peuvent être retournés à la chambre froide à des fins de plantation ultérieure.

Pour favoriser une croissance optimale, les semis de chêne doivent être exposés à une température de 22 °C et à une photopériode de 17/7 h (L/O) sous éclairage fluorescent ordinaire. Il est recommandé d'enduire les vitres de la serre de peinture blanche en été, de manière à réduire le rayonnement thermique par le verre. La lumière ne doit pas être trop intense. Les lampes au sodium sont à éviter, car elles assèchent l'air. L'apparition des premières feuilles survient normalement 3 à 6 semaines après la plantation, mais elle peut être retardée si la température s'abaisse sous le seuil de 20 °C la nuit. Si l'on ne dispose pas d'une serre, on peut utiliser des espaces de bureau équipés d'un système d'éclairage fluorescent émettant environ 20 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$ au niveau des semis (figure 4). Une fois la croissance du feuillage tendre achevée, les semis sont transférés dans une chambre froide (7 °C) humidifiée, en présence des mêmes conditions d'éclairage. Ces semis peuvent être utilisés pendant une période maximale de 2 mois, après quoi leur feuillage devient plus coriace et ne convient plus aux chenilles de la spongieuse, qui préfèrent un feuillage tendre et succulent.

Il faut disposer en tout temps d'une bonne réserve de feuillage frais pour l'exposition des chenilles au parasitoïde. C'est une des conditions essentielles au succès de l'élevage. Les glands doivent donc avoir été recueillis en nombre suffisant et mis à germer longtemps à l'avance.

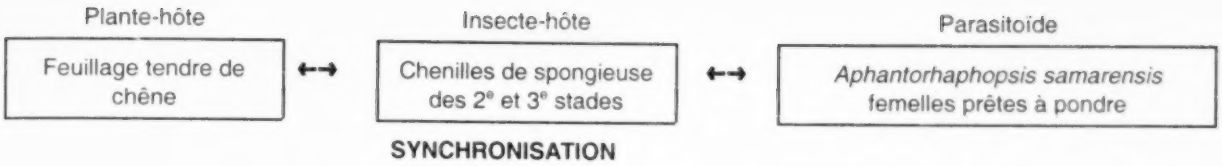

Figure 1. Schéma conceptuel de l'interaction entre l'hôte et le parasitoïde.

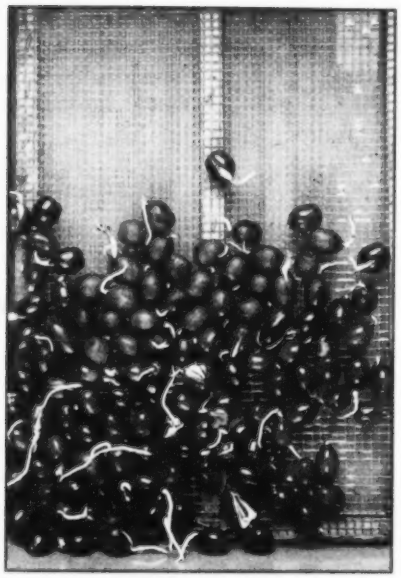

Figure 2. Glands germés de chêne rouge (*Quercus rubra*).

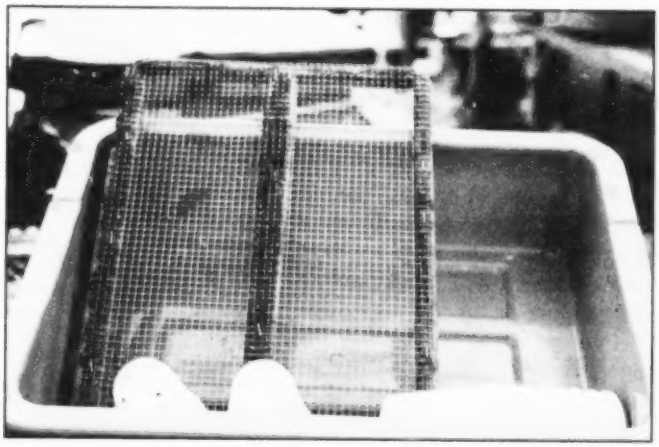

Figure 3. Bassin en plastique et treillis métallique supportant les gobelets contenant les semis de chêne.

Figure 4. Espace de bureau équipé d'un système d'éclairage pour la culture des semis de chêne.

L'insecte-hôte

Les masses d'oeufs de spongieuse (*Lymantria dispar* L.) peuvent être recueillies en automne dans les habitats où les populations naturelles du ravageur sont relativement élevées. De retour en laboratoire, les masses d'oeufs sont entreposées à des températures de 2 à 4 °C (en présence d'humidité) pendant au moins 4 mois (diapause), puis exposées à une température de 25 °C pour provoquer leur éclosion. Si ces conditions ne sont pas respectées, la durée d'incubation est plus longue. L'utilisation de masses d'oeufs récoltées sur le terrain comporte toutefois certains inconvénients. Ainsi, un fort pourcentage des oeufs récoltés à la fin de l'hiver ou au début du printemps n'éclosent pas, n'ayant pas été protégés adéquatement par la neige contre les grands gels. Les masses d'oeufs utilisées au Centre de foresterie des Laurentides provenaient d'un élevage en laboratoire (USDA Otis Methods Development Center, Otis ANGB, Massachusetts, États-Unis). Ces masses d'oeufs (figure 5) ont été déposées sur une feuille de papier kraft brun et entreposées pendant 6 à 7 mois dans une chambre froide. En présence de telles conditions, les oeufs éclosent en 2 jours dès qu'ils sont exposés à une température de 25 °C.

Pour maintenir un élevage efficace du parasitoïde, il faut avoir en tout temps à sa disposition un très grand nombre de chenilles des deuxième et troisième stades. Les éléments suivants sont d'une importance capitale :

- Entreposage des masses d'oeufs en post-diapause. Les masses d'oeufs ayant déjà subi une diapause d'environ 175 à 200 jours peuvent être conservées entre 5 et 7 °C (en présence d'humidité) pendant 1½ mois. Durant la deuxième moitié de cette période, le taux d'éclosion diminue progressivement.

- Stérilisation de la surface des masses d'oeufs. Avant l'incubation, l'immersion des masses d'oeufs pendant 1 h dans une solution de formaldéhyde à 10 % (v/v) [10 cc de HCHO commercial à 37 % (p/p) dilué dans l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume final de 100 cc], suivie d'un rinçage sous eau courante pendant 2 h, permet de réduire l'incidence des polyédroses virales (Odell et collab., 1985). Les masses d'oeufs sont enlevées à l'aide d'une spatule du papier sur lequel elles avaient été déposées, puis immergées dans un bécher à raison de 100 masses d'oeufs par traitement (figure 6, à gauche). Un treillis métallique disposé en-dessous de la surface de la solution de trempage aide à maintenir les masses d'oeufs immergées. À l'étape du rinçage, les masses d'oeufs sont transférées dans des cylindres en plastique (10 x 5 cm) munis d'un couvercle-pression et dont le fond est garni d'un petit morceau de treillis métallique (figure 6, à droite). Les cylindres sont maintenus immergés dans le bac d'eau à l'aide de cornières en acier lourd. Des canalisations en plastique installées de part et d'autre du bac assurent une circulation rapide de l'eau du robinet (figure 7). Une fois rincées, les masses d'oeufs sont mises à incuber sur milieu nutritif artificiel.

- Préparation de la diète artificielle. Sa formulation (Bell et collab., 1981) s'établit comme suit :

Eau	1 200 mL
Gélose	22,5 g
Caséine	37,5 g
Mélange de sels minéraux (Wesson)	12,0 g
Acide sorbique	3,0 g
Méthylparaben	1,5 g
Germe de blé	180,0 g
Prémélange vitaminé (Vanderzant)	15,0 g

Cette recette donne environ 1 400 mL de milieu nutritif. Elle comporte les étapes suivantes : faire bouillir de l'eau dans une casserole de 3 L; ajouter la gélose et faire bouillir de nouveau. Ajouter la caséine, le mélange de sels minéraux, l'acide sorbique et le méthylparaben en mélangeant bien pour dissoudre complètement le méthylparaben. Faire bouillir de nouveau et ajouter le germe de blé. Si le mélange commence à mousser, ajouter le reste du germe de blé pour stopper la formation de mousse. Avant d'ajouter le prémélange vitaminé, faire bouillir le mélange pendant 10 à 30 secondes afin de détruire les enzymes (lipases) qui, autrement, pourraient dégrader des éléments nutritifs essentiels pour les chenilles. Verser le mélange dans un mélangeur (modèle commercial de 2 L de marque Waring) et ajouter le prémélange vitaminé, en agitant bien afin de dissoudre les vitamines. Mélanger pendant 2 minutes à haute vitesse. Verser dans les contenants d'élevage appropriés.

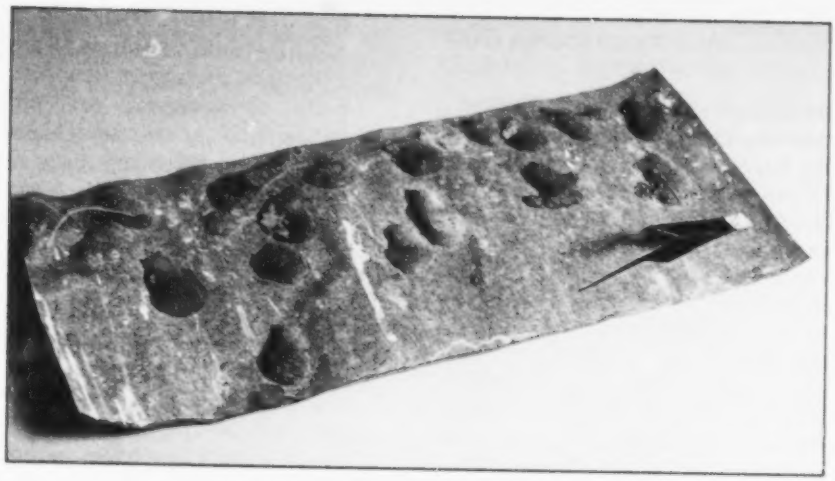

Figure 5. Masses d'oeufs de spongieuse (*Lymantria dispar*) pondues sur du papier.

Figure 6. À gauche : masses d'oeufs de spongieuse immergées dans une solution de formaldéhyde. À droite : cylindre en plastique utilisé pour retenir les masses d'oeufs durant leur rinçage.

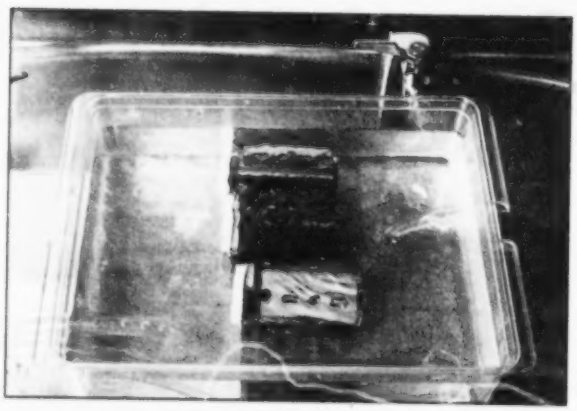

Figure 7. Système d'échange rapide de l'eau utilisé pour le rinçage des masses d'oeufs.

- Contenants d'élevage. Trois types de contenants d'élevage ont été utilisés :

  Type 1.
  Grand contenant ERA en plastique, carré, 908 mL, muni d'un couvercle bien ajusté (fabriqué par ERAWARE, Ville Saint-Laurent, Qc). Une centaine d'orifices de 0,68 mm de diamètre sont pratiqués sur le pourtour du couvercle. Ces orifices doivent être assez petits pour empêcher la fuite des chenilles néonates. Une couche de milieu nutritif de 0,5 cm d'épaisseur est déposée sur la face interne du couvercle ou au fond de chaque contenant. Ces contenants sont utilisés pour l'incubation des masses d'oeufs et l'alimentation des chenilles jusqu'au deuxième stade. Une recette de milieu nutritif permet de remplir 20 contenants de ce type (figure 8). Malheureusement, lorsque ces contenants sont lavés et réutilisés, les couvercles perdent leur étanchéité, et les chenilles néonates peuvent s'échapper du contenant. Il faut donc soit utiliser du ruban toile pour boucher les ouvertures ou remplacer les vieux contenants par des nouveaux.

  Type 2. (jetable)
  Contenant semi-transparent de 163 mL (No. P550), muni d'un couvercle-pression (No. PL5) (fabriqué par SOLO Cup Company, Urbana, Illinois, États-Unis) et rempli d'une couche de milieu nutritif de 0,5 cm d'épaisseur (figure 9). Ces contenants sont utilisés pour l'alimentation des jeunes chenilles recueillies sur le feuillage dans les cages d'exposition au parasitoïde.

  Type 3. (jetable)
  Contenant d'élevage composé constitué d'un contenant SOLO (voir description ci-dessus) ajusté fermement par pression à un verre en mousse de polystyrène de manière à obtenir un joint étanche. Le fond du contenant SOLO est percé d'environ 15 orifices (0,25 cm de diamètre) permettant le passage des larves matures du parasitoïde. Les larves qui ont traversé sont recueillies au fond du verre en mousse de polystyrène. La préparation de milieu nutritif est déposée sur la face interne du couvercle-pression. Les composantes de ce contenant composé sont maintenues fermement en place au moyen d'une bande élastique (figure 10).

Les contenants d'élevage remplis de milieu nutritif se conservent au moins 2 semaines entre 2 et 8 °C. Il est important de disposer en tout temps d'une bonne réserve de contenants déjà préparés.

- Élevage des chenilles sur milieu nutritif. Un à trois des masses d'oeufs dont la surface a préalablement été stérilisée sont placées dans un contenant de type 1 et mises à incuber à 25 °C en présence d'une humidité relative de 35 à 60 %. Il faut prévoir environ 40 contenants pour 100 masses d'oeufs. À cette température, les chenilles néonates parviennent au deuxième stade en 7 jours. Les chenilles du deuxième stade se reconnaissent à leur couleur noir de suie. Avant que les chenilles aient atteint le deuxième stade, il est recommandé de transférer le matériel de chaque unité dans deux nouveaux contenants préalablement garnis d'une préparation fraîche de milieu nutritif. Cette précaution réduit le risque de contamination et empêche les chenilles de se nourrir de leurs déjections. Une fois que les chenilles ont atteint le deuxième stade, les contenants sont entreposés à 7 °C; à cette température, les chenilles s'alimentent très peu. Cette façon de faire fournit un approvisionnement continu en chenilles pendant 1 à 1½ mois. Il est toutefois recommandé d'utiliser rapidement les chenilles dans les cages d'exposition de façon à prévenir l'apparition de moisissures durant cette période. Les cultures contaminées par des moisissures doivent être éliminées. Durant la récolte des chenilles destinées à être exposées au parasitoïde, les cultures sont inévitablement exposées de façon répétée à la température de la pièce, si bien que les chenilles du deuxième stade finissent par atteindre le troisième stade. Cela ne nuit pas puisque les chenilles du troisième stade constituent des hôtes tout aussi acceptables pour l'*A. samarensis*.

  Il est essentiel d'utiliser des chenilles en bonne santé, car l'état des chenilles joue un rôle déterminant sur les taux d'attaque et la production de puparium en santé.

Le parasitoïde

Biologie de l'*A. samarensis*. L'*A. samarensis* est un endoparasitoïde ovolarvipare. Les femelles déposent leurs oeufs sur les soies des chenilles de spongieuse des deuxième et troisième stades. Les larves néonates percent rapidement la cuticule de l'hôte pour gagner l'hémocèle en formant un canal respiratoire qui laisse une cicatrice circulaire foncée sur la chenille. La vie larvaire comporte trois stades, et les mues s'effectuent dans le tube respiratoire. Le développement est rapide (figure 11). Dans les conditions de laboratoire, la larve mature du parasitoïde quitte l'hôte 8 à 14 jours après l'attaque initiale, et la formation du puparium survient dans les 12 heures qui suivent. Dans les cohortes non hibernantes, la durée totale du cycle de développement de l'oeuf à l'adulte est de 20 à 26 jours à 25 °C, ou de 33

à 40 jours à 20/15 °C (12/12 heures, jour/nuit). En nature, l'*A. samarensis* est essentiellement univoltin, mais il peut présenter une deuxième génération partielle durant les étés anormalement chauds. En laboratoire, le stade de quiescence est facultatif, et la diapause est inhibée si les pupariums, une fois formés, sont conservés à 20 °C. Chaque femelle produit entre 30 et 100 pupariums durant sa vie. La durée de vie moyenne du parasitoïde s'établit à environ 40 jours (Quednau, 1993).

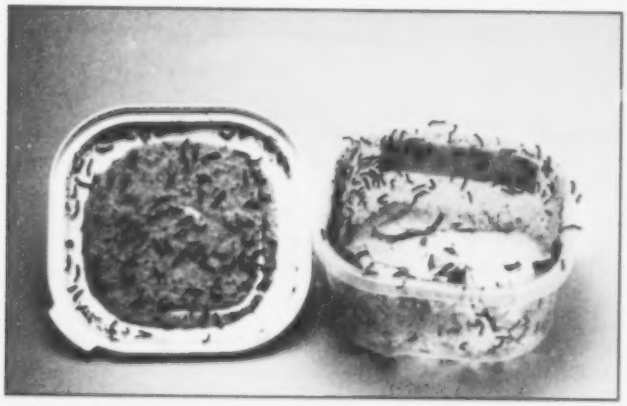

Figure 8. Contenant en plastique (type 1) permettant d'élever sur diète artificielle un grand nombre de chenilles de spongieuse.

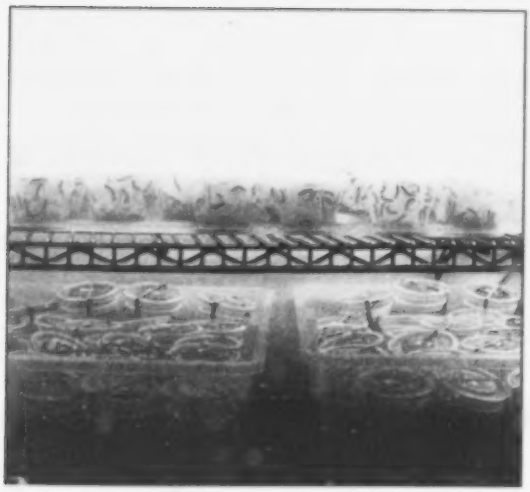

Figure 9. Contenants SOLO utilisés pour l'élevage sur diète artificielle des chenilles de spongieuse exposées à l'*A. samarensis*. Tablette du haut : contenant simples. Tablette du bas : contenants composés.

Figure 10. Parties d'un contenant d'élevage composé utilisé pour séparer les larves matures du parasitoïde des chenilles non parasitées. Le milieu nutritif artificiel est déposé sur la face interne du couvercle. À gauche : unité assemblée.

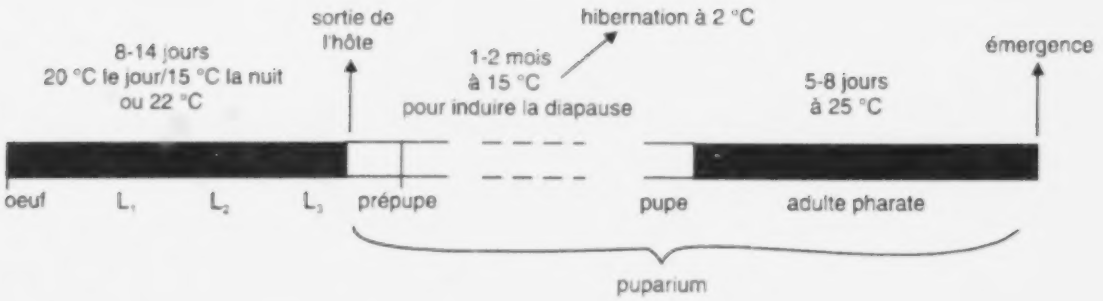

Figure 11. Cycle de vie de l'*A. samarensis* en laboratoire.

- Cages de confinement des adultes. Malgré son aspect frêle et délicat, l'*A. samarensis* adulte est capable d'un vol rapide et élusif. L'insecte se déshydrate rapidement et a besoin d'une humidité atmosphérique très élevée, et les adultes boivent de l'eau fréquemment. Le plan général des cages est inspiré d'Odell et Godwin (1979). Nous avons cependant remplacé les parois rigides par une housse en tulle pour permettre aux adultes de voler sans s'abîmer les ailes et pour obtenir une meilleure aération.

Trois types de cage ont été utilisés :

1. Cage d'émergence (figure 12). Ce type de cage permet aux adultes d'émerger dans une atmosphère saturée d'eau. Les parois rigides ont été remplacées par une housse de tulle. Partie du bas : même bac que celui utilisé pour la culture des semis (Rubbermaid), mais rempli d'eau. Partie du haut : base en plastique découpée dans la partie supérieure du bac Rubbermaid, surmontée d'une housse de tulle tendue sur des arceaux en métal dont la base s'insère dans des triangles en plastique (plexiglas) retenus par des vis dans les coins; le fond est constitué d'une moustiquaire en nylon (Nitex Nylon Monofilament Bolting Cloth, n°HC3-475, 14 brins/cm; SEFA Canada, Ville Saint-Laurent, Qc) fixée au cadre de plastique avec de la colle en bâton Bostic. Une bande de caoutchouc mousse collée sur les bords assure une meilleure étanchéité. La moustiquaire en nylon peut être remplacée par du tulle, mais les plus petits insectes risquent alors de tomber dans l'eau. La cage mesure 37 × 50 × 55 cm. Un sac de plastique est ramené au-dessus de la cage et fermé hermétiquement autour du bord inférieur de la cage. Une ouverture de 16 cm permet d'introduire les boîtes de Petri contenant les puparіums et de récolter les adultes qui viennent d'émerger; cette ouverture se ferme à l'aide d'un bouchon en caoutchouc mousse. Une fois fermée hermétiquement, la cage est maintenue au dessus du bac d'eau à l'aide de quatre grosses pinces Foldback 1414.

2. Cage de confinement des mâles et des femelles après l'émergence et durant l'accouplement (figure 13). Cette cage est constituée d'une housse en tulle fixée au moyen de colle en bâton Bostic sur des arceaux en métal et d'un fond en plastique (plexiglas). Elle mesure de 25 × 25 × 18 cm. Sur un côté, une ouverture de 4 cm de diamètre pouvant être fermée par un bouchon en caoutchouc mousse permet d'insérer dans la cage un petit récipient d'eau muni d'une mèche en coton dentaire (figure 16, au centre) et d'introduire et de récupérer les parasitoïdes.

3. Cage de gestation et d'exposition au parasitoïde (figure 14). La partie supérieure de cette cage est constituée d'une housse de tulle tendue sur des arceaux en métal fixés à un cadre en plastique. Ce cadre s'obtient en découpant horizontalement une boîte en plastique de 23 × 30 × 40 cm (T-295, Althor Products, Bethel, Connecticut, États-Unis) en trois parties. Les arceaux sont ancrés avec de la résine époxyde dans des trous forés dans les coins du cadre ou sur des triangles en plexiglas de 6 mm d'épaisseur collés dans les coins de la cage. Le fond amovible, constitué d'une pièce de mousse en polystyrène de 38 mm d'épaisseur (pour de meilleurs résultats, nous recommandons la marque Cladmate XL Styrofoam, Dow Canada), est percé de quatre ouvertures de 5 cm de diamètre destinées à

recevoir quatre semis de chêne en pot. Il faut veiller à ce que la partie supérieure de la cage épouse bien le contour du fond amovible de façon à prévenir la fuite des insectes. À cette fin, nous recommandons de coller une bande en caoutchouc mousse sur la paroi interne du cadre en plastique de la partie supérieure. Sur un côté, une première ouverture de 3 cm de diamètre aménagée près du sommet de la cage permet d'introduire les parasitoïdes; plus bas, une deuxième ouverture de 10 cm de diamètre est prévue pour la récupération des parasitoïdes. Les deux ouvertures peuvent être fermées à l'aide d'un bouchon en caoutchouc mousse. Une plus grande version de cette cage, mesurant 45 × 32 × 55 cm, a également été utilisée; son cadre est fait du même matériel que celui des cages d'émergence (figure 15).

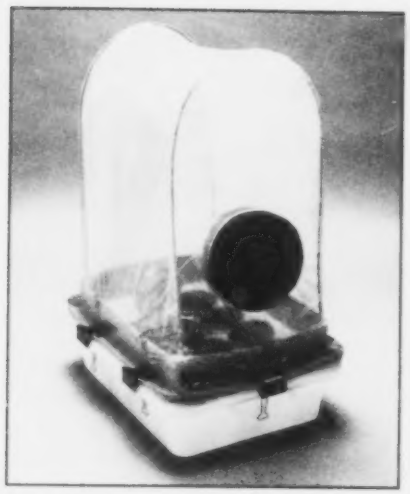

Figure 12. Cage d'émergence.

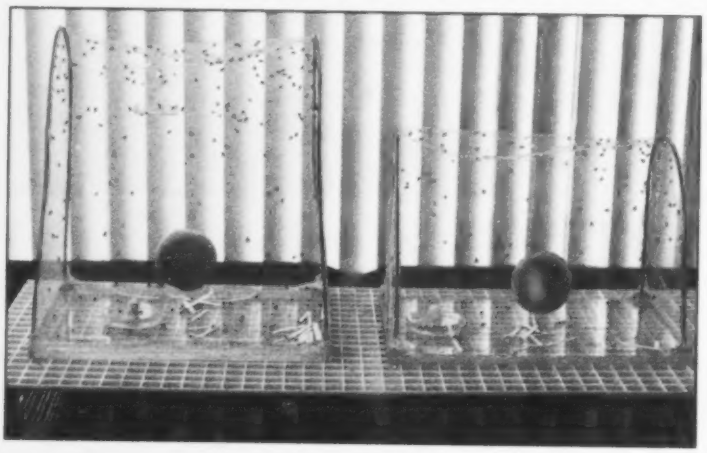

Figure 13. Cages de confinement des parasitoïdes mâles et femelles après l'émergence et durant l'accouplement.

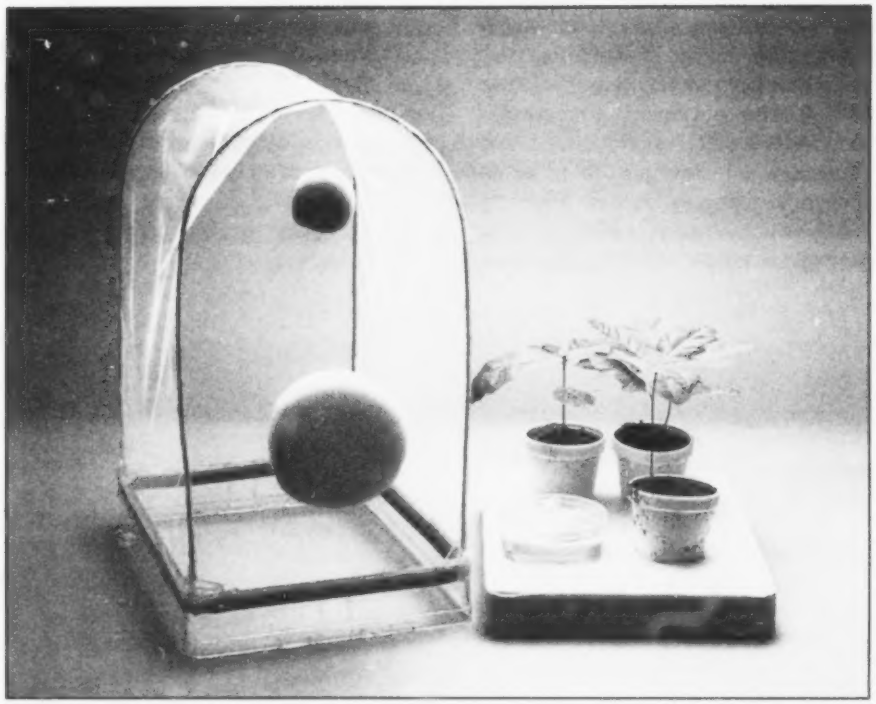

Figure 14. Cage de gestation et d'exposition au parasitoïde. À gauche : partie supérieure, faite de tulle; une bande de caoutchouc mousse assure l'étanchéité de la cage. À droite : partie inférieure, faite de mousse en polystyrène. On aperçoit des semis de chêne et la mèche en coton dentaire trempant dans l'eau.

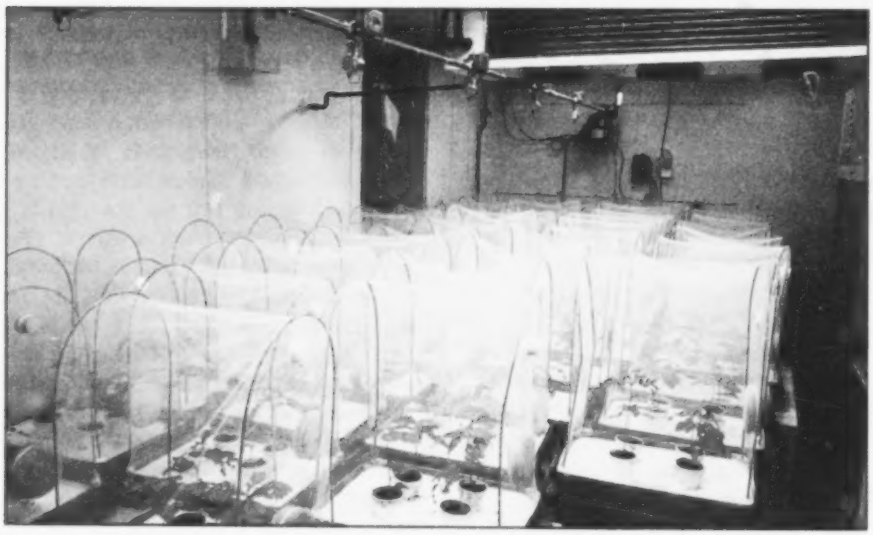

Figure 15. Grandes cages d'exposition dans la salle d'élevage équipée d'un système de pulvérisation automatique.

– Nourriture pour les parasitoïdes adultes. Une petite boîte de Petri (n° 1006 Falcon, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, New Jersey, États-Unis) contenant une mèche en coton dentaire trempant dans de l'eau distillée est insérée dans chaque cage de type 2 (figure 16, au centre). Dans les cages d'exposition, la mèche est raccordée à un contenant cylindrique de plus grande taille (8,25 × 8,25 cm, n° R15, Althor Products) (figure 16, rangée du haut, à gauche). Une gelée à base de miel et de gélose est étalée sur le dessus des cages à housse de tulle. La composition de cette gelée est la suivante :

Eau	130 mL
Miel	10 g
Sucre	20 g
Gélose	0,55 g

Cette gelée se prépare comme suit : ajouter les ingrédients à l'eau froide et amener lentement la solution à ébullition en agitant constamment, puis laisser reposer. Une cuisson prolongée produit une solution trop concentrée et est donc à éviter. Verser la solution obtenue dans un grand plat en plastique (Falcon Plastics, 150 × 25 mm) et refroidir au réfrigérateur. Répartir la solution refroidie dans de petits flacons collés sur le couvercle des boîtes de Petri au moyen d'une pipette propre (figure 16, rangée du haut, au centre). La gelée doit être conservée au réfrigérateur et renouvelée aux deux semaines. De l'eau distillée doit être aspergée sur les cages au moins deux fois par jour.

– Émergence. Les puparium en post-hibernation sont exposés dans un premier temps à une température de 15 °C pendant 5 jours; ceux qui n'ont pas hiberné sont exposés immédiatement à une température de 22 à 25 °C et à une photopériode de 18/6 heures (L/O). Les puparium déposés sur de la mousse de tourbe humide dans une grande boîte de Petri en plastique (Falcon Plastics, 150 × 25 mm) sont placés sur le fond en moustiquaire de nylon de la cage d'émergence (figures 12 et 17). La mousse de tourbe est suffisamment humide lorsque plus aucune goutte d'eau ne s'en échappe. Le taux d'humidité à l'intérieur de la cage doit s'élever à près de 100 %. Dès l'apparition des premiers adultes, il faut inspecter chaque cage deux fois par jour afin de recueillir un à un tous les parasitoïdes qui ont émergé à l'aide d'un petit flacon (35 × 10 mm) propre et sec pourvu d'un bouchon hermétique en caoutchouc mousse, en veillant à ne mettre qu'un seul adulte par flacon (figure 18). Une fois tous les adultes récupérés, il faut asperger de l'eau distillée sur les puparium restants afin de prévenir l'assèchement de la tourbe. Parmi les cohortes de puparium en post-hibernation, ce sont les mâles qui émergent en premier (figure 19). Parmi les cohortes qui n'ont pas hiberné, les deux sexes émergent simultanément (figure 20). Parmi les cohortes de puparium en post-hibernation, en particulier parmi celles qui n'ont pas été exposées à une diapause de durée uniforme à 2 °C, il s'écoule suffisamment de temps entre l'émergence des mâles et celle des femelles pour que pratiquement toutes les femelles puissent subséquemment s'accoupler. À 2 °C, l'hibernation doit durer au moins 100 jours. Dans ce cas, l'émergence à 22 °C peut s'étaler sur 30 jours, parfois davantage. Plus la durée de l'hibernation est brève, plus l'émergence des adultes pharates est retardée.

– Sexage. Les adultes à sexer sont examinés à la loupe à travers les parois du flacon. Chez le mâle, les pièces génitales, brunes et sclérifiées, sont contenues dans un repli ventral de la partie apicale de l'abdomen (pinces). L'abdomen de la femelle est lisse, et son extrémité est faiblement tubulaire (figure 21). Une fois le sexage effectué, les mâles et les femelles sont transférés dans des cages de confinement distinctes à raison de 40 à 60 adultes par cage. Pendant 3 jours, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'ils aient atteint leur maturité sexuelle, les mâles sont exposés à une thermopériode de 22/15 °C [12/12 heures (jour/nuit)], sous un éclairage fluorescent ordinaire émettant environ 2 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$ au niveau de la cage. Pour leur part, les femelles sont exposées à une température de 15 °C et à un éclairage de faible intensité de manière à ce qu'elles demeurent peu actives jusqu'à l'accouplement. La date d'émergence doit être indiquée sur chaque cage de confinement, et de nouvelles cages doivent être utilisées chaque jour. De cette façon, on peut connaître l'âge exact de chaque cohorte de parasitoïdes. Pour retirer une femelle de sa cage, on se sert d'un flacon autour duquel un fil de fer servant de poignée a été enroulé au préalable. La femelle se laisse tomber dès qu'elle est effleurée (figure 16, rangée du bas, au centre).

Figure 16. Matériel utilisé pour l'alimentation et la récupération des *A. samarensis* adultes. Rangée du haut, à gauche : grand contenant renfermant de l'eau et une mèche en coton; au centre : gelée à base de miel et de gélose déposée dans une boîte de Petri au moyen d'une pipette; plus bas, au centre : petite boîte de Petri contenant de l'eau et une mèche en coton; à droite : bandelettes de papier cartonné. Rangée du bas, à gauche : flacon en butyrate à fond perforé avec bouchon en polyéthylène; au centre : petit flacon muni d'un bouchon en caoutchouc mousse et fil de métal utilisé pour la capture des parasitoïdes.

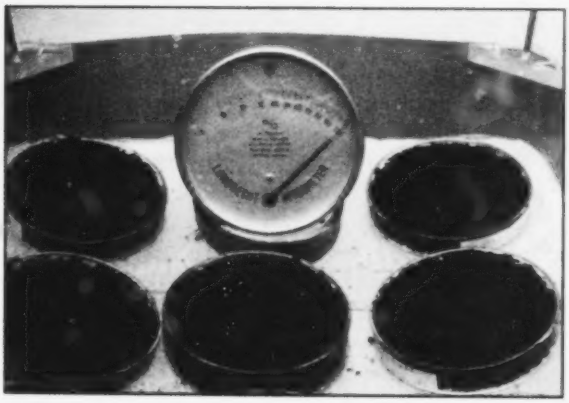

Figure 17. Pupariums sur de la mousse de tourbe dans une cage d'émergence.

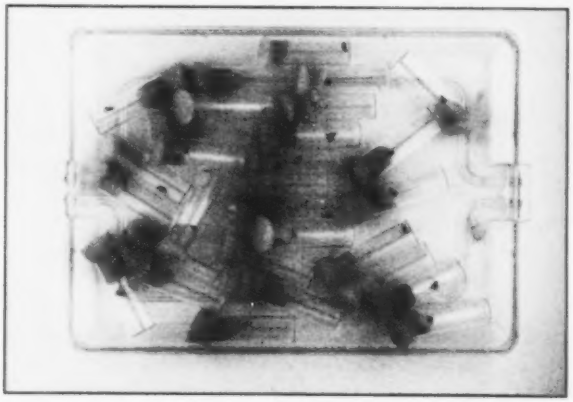

Figure 18. Flacons fermés contenant des parasitoïdes adultes.

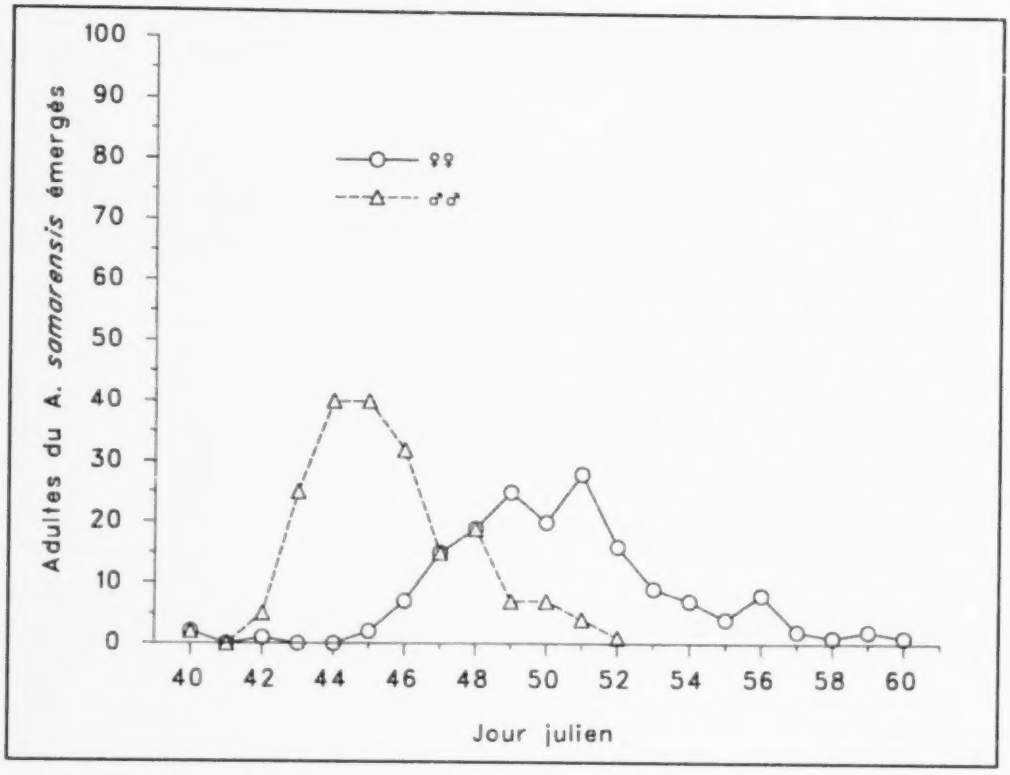

Figure 19. *A. samarensis* : émergence de 1 119 puparíums post-hibernants (135 à 150 jours entre 2 et 4 °C) après incubation à 15 °C pendant 6 jours, puis à 22 °C.

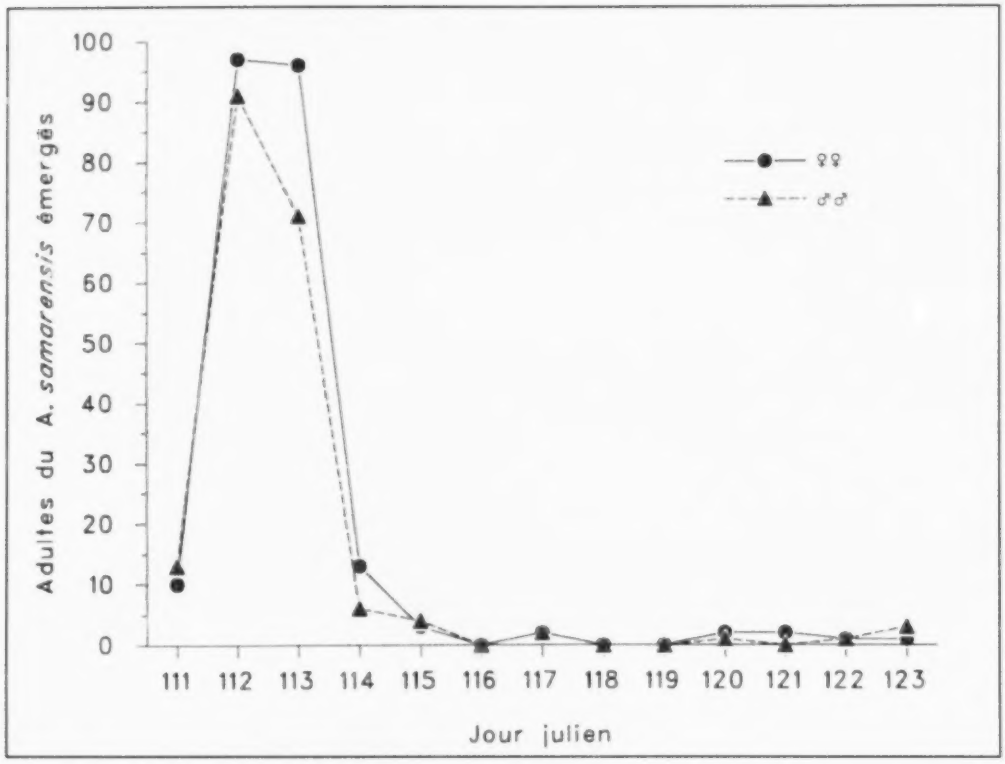

Figure 20. *A. samarensis* : émergence de 1 074 puparium non hibernants de la deuxième génération, après incubation à 25 °C.

- Accouplement. Pour obtenir un taux d'accouplement élevé, il faut apparier des mâles et des femelles appartenant à des classes d'âge différentes. Les mâles doivent être âgés d'au moins 3 jours et plus vieux que les femelles; celles-ci doivent être âgées de 1 à 4 jours (au maximum 5). Les femelles fraîchement émergées s'accouplent le plus facilement. L'accouplement dure 2½ à 3 heures. Le taux de succès des accouplements varie entre 60 et 80 % en laboratoire. Il est recommandé de respecter les étapes suivantes et d'utiliser le matériel illustré aux figures 13 et 22.

  - Les cages d'accouplement doivent être placées devant une grande fenêtre. L'intensité lumineuse optimale pour l'accouplement se situe entre 20 et 100 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$ (maximum de 150 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$) au niveau de la cage. Les mâles prêts à s'accoupler devraient former un essaim dans la cage. Une variation de la densité du couvert nuageux ou de l'intensité lumineuse de l'ordre de 50 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$ stimule l'activité d'accouplement. En revanche, les insectes sont habituellement inactifs lorsque le ciel est entièrement couvert ou lorsque le temps est pluvieux. Pour stimuler les parasitoïdes, on peut diriger un jet d'air chaud sur les cages à l'aide d'un séchoir électrique ou transférer les cages d'un corridor sombre à une pièce bien éclairée. Une gelée à base de miel et de gélose doit être étalée sur les parois en tulle de la cage.

- Pour provoquer le début de l'accouplement, il faut introduire 5 femelles vierges dans une cage contenant des mâles, puis ajouter une femelle pour chaque accouplement observé. Le taux de succès de l'accouplement augmente en fonction du nombre de mâles dans la cage (figure 23).

- Chaque couple est délicatement transféré sur une bandelette de carton (figure 24) de la cage d'accouplement à un flacon en butyrate de 2,5 × 7,5 cm muni d'un couvercle bien ajusté en polyéthylène (Althor Products). Le fond de chaque flacon doit avoir été perforé au préalable (figure 16, rangée du bas, à gauche). Les flacons contenant les couples sont transférés dans un milieu d'un fort pourcentage d'humidité. Pour recréer ces conditions, il suffit de placer une vitre sur un bac en plastique rempli d'eau (figure 25). Durant l'accouplement, les mouches demeurent pratiquement immobiles, mais une fois l'accouplement terminé, elles recommencent à se déplacer dans le flacon.

- Une fois les partenaires isolés et leur sexe déterminé, les mâles sont retournés dans leur cage originale, tandis que les femelles accouplées sont transférées dans des cages de gestation (figure 14). Pour isoler le mâle de la femelle, il suffit d'enlever le bouchon du flacon contenant le couple et d'appliquer l'ouverture de ce flacon contre celle d'un deuxième flacon vide. Dès qu'une des mouches pénètre dans le deuxième flacon, les deux flacons sont rebouchés. Il est alors facile de déterminer le sexe des parasitoïdes.

- Il faut effectuer toutes ces manipulations sous une grande housse de tulle tendue sur des arceaux en métal, de manière à pouvoir recapturer facilement les mouches qui pourraient s'échapper (figure 26). Le taux de succès des accouplements dépend étroitement de la rapidité avec laquelle s'effectue le renouvellement des mâles et des femelles.

- Les accouplements demandant beaucoup de temps, il est recommandé d'amorcer les manipulations en début de journée. L'activité d'accouplement atteint son intensité maximale en début d'après-midi, mais elle peut se prolonger jusqu'à 22 heures. Une fois la fin des accouplements confirmée, les cages d'accouplement (contenant encore quelques femelles non accouplées) sont soumises à une thermopériode de 15/10 °C [12/12 heures (jour/nuit)] en présence d'une humidité relative de 95 % et d'une photopériode de 12/12 heures (L/O) sous éclairage modéré. Ces conditions contribuent à accroître la durée de vie des parasitoïdes. Il peut arriver que l'on n'ait pas le temps de séparer tous les couples avant la fin de la journée de travail. Dans ce cas, on peut laisser les couples restants dans la chambre humide jusqu'au lendemain matin, mais il faut déposer une petite goutte de gelée à base de miel et de gélose dans le fond du flacon.

- L'ardeur reproductrice des mâles qui se sont accouplés à plusieurs reprises au cours de la première journée s'affaiblit généralement au cours des journées qui suivent.

- La présence d'un grand nombre de femelles plus vieilles que 5 jours dans la cage d'accouplement est à éviter. Ces femelles doivent être retirées de la cage, car leur présence peut réduire l'ardeur reproductrice des mâles.

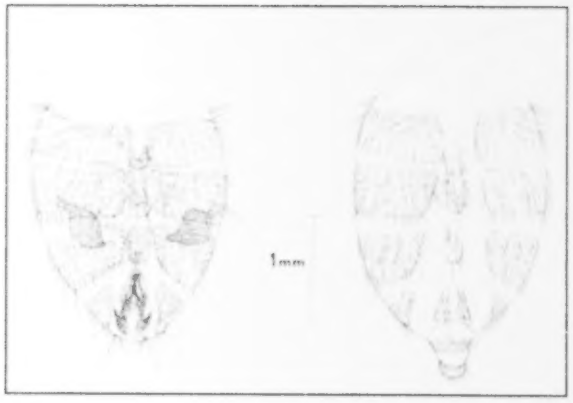

Figure 21. Vue ventrale de l'abdomen de l'*A. samarensis* montrant les structures génitales. À gauche : mâle; à droite : femelle.

Figure 22. Cages d'accouplement installées au-dessus de bacs d'eau et recouvertes d'une housse en plastique pour maintenir un taux d'humidité élevé.

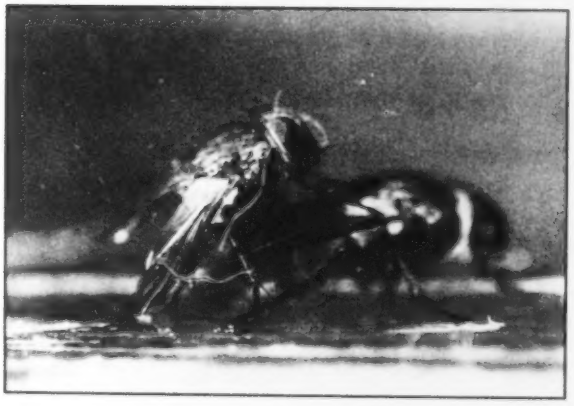

Figure 23. Accouplement chez l'*A. samarensis*.

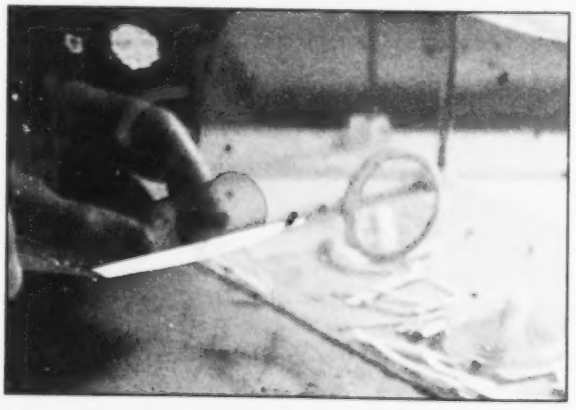

Figure 24. Récupération à l'aide d'une bandelette de carton d'un couple *in copula* d'*A. samarensis* venant d'une cage d'accouplement.

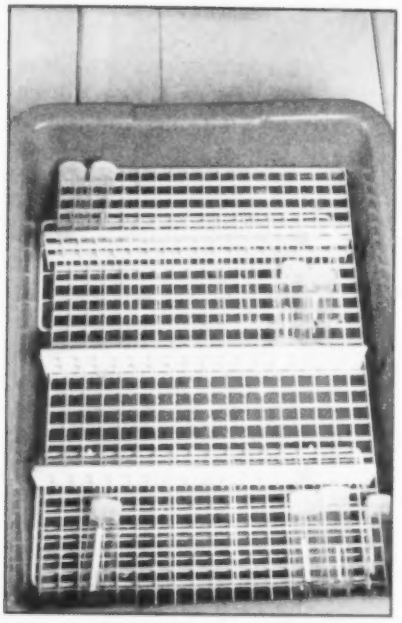

Figure 25. Bac d'eau permettant de garder dans une humidité élevée les mouches qui viennent d'une cage d'accouplement jusqu'à la fin du coït.

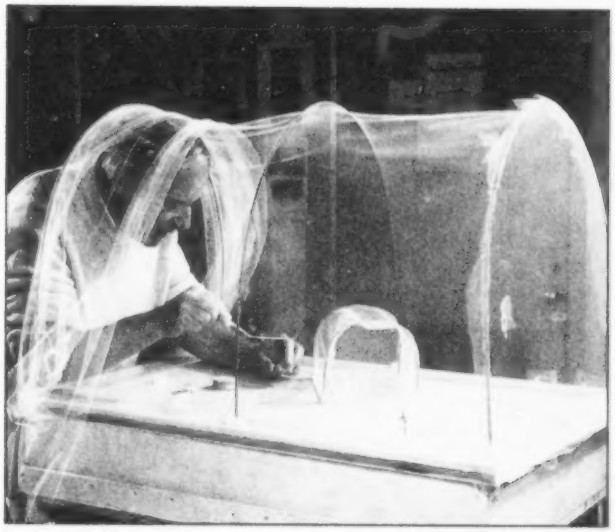

Figure 26. Grande housse de tulle tendue sur des arceaux de métal empêchant la fuite des parasitoïdes.

- Gestation. Durant la période de gestation, les parasitoïdes accouplés sont réunis en groupes de 20 à 40 dans des cages de gestation (figure 14) contenant des semis de chêne. Le modèle de cage plus spacieux (45 x 32 x 55 cm) peut loger jusqu'à 100 parasitoïdes. Une gelée à base de miel et de gélose est étalée sur le dessus des cages, et un contenant renfermant une mèche trempant dans l'eau est placé dans la cage. Il est recommandé de remplacer les cages utilisées par des cages propres au moins une fois par semaine et de veiller à ce que la préparation à base de gélose et de miel ne soit pas contaminée par des microorganismes. Il faut également réduire l'intensité de l'éclairage de manière à ce que les mouches soient peu actives. Un taux d'humidité de 95 % doit être maintenu durant toute la période de gestation. Si l'on ne dispose pas de salles d'élevage humidifiées, les cages de gestation doivent être installées au-dessus d'un bac d'eau similaire à celui utilisé dans les cages d'accouplement (figure 22). De l'eau distillée doit être aspergée sur les cages deux fois par jour. Peu avant la fin de la période de gestation, c'est-à-dire environ le dixième jour à 20/15 °C [12/12 heures (jour/nuit)], quelques chenilles de spongieuse doivent être placées sur le feuillage des semis de chêne. Il est important que les jeunes femelles prêtes à se reproduire soient en contact avec l'insecte-hôte, comme elles le seraient dans leur milieu naturel, où le développement de l'insecte-hôte et celui de son parasitoïde sont parfaitement synchronisés. La période de gestation peut être étendue à 17 jours si la température est abaissée de 20/15 °C à 15/10 °C [12/12 heures (jour/nuit)] une journée sur deux. La mortalité des femelles durant la gestation peut osciller entre 10 et 50 %. Lorsqu'un grand nombre de femelles sont confinées dans une même cage, il faut s'attendre à ce qu'un certain pourcentage d'entre elles se blessent. Odell et collab. (1979) font état d'un taux de mortalité avant oviposition de 52 % chez le *Blepharipa pratensis* (Meig.); les pertes étaient principalement imputables à une infection bactérienne. Les cages de gestation doivent être nettoyées minutieusement avant chaque utilisation. Ces cages devraient être fabriquées avec du matériel neuf ou traitées par irradiation ultraviolette après avoir été lavées avec de l'alcool à 70 %.

- Exposition à l'hôte. Vers la fin de la période de gestation, les parasitoïdes femelles sont introduits, à raison d'une ou de deux femelles par cage, dans les cages d'exposition contenant 20 à 30 chenilles de spongieuse du deuxième stade préalablement

installées sur le feuillage de semis de chêne (figure 14). Seules les chenilles qui sont en bonne santé et qui s'alimentent activement sont attaquées. Pour s'assurer que les chenilles s'agrippent bien au feuillage et ne tombent pas au fond de la cage, il faut d'abord les placer dans des boîtes de Petri avant de les diriger vers le feuillage à l'aide d'un petit pinceau à poils souples. Toutes les cages d'exposition doivent être numérotées de façon séquentielle. Le remplacement des chenilles sur le feuillage doit être soigneusement planifié. Les chenilles destinées à être exposées aux parasitoïdes femelles peuvent être placées, une journée à l'avance, dans des boîtes de Petri ne contenant aucune nourriture, par petits groupes de 20 à 30, et peuvent être conservées à 8 °C jusqu'au lendemain. Une fois mises en présence des parasitoïdes, les chenilles doivent demeurer dans la cage durant au moins 2 jours, au maximum 3. Selon le niveau d'aide technique dont on dispose, on peut maintenir un roulement allant jusqu'à 100 cages d'exposition par jour. Si les mouches sont immobiles sur les parois de tulle, leur transfert peut être réalisé rapidement en déposant la partie supérieure de la cage de confinement sur la base nouvellement préparée contenant des chenilles et du feuillage de chêne. Une autre façon de faire consiste à capturer chaque mouche individuellement à l'aide d'un petit flacon. Le bac d'eau et la mèche doivent être changés à chaque transfert. Il est également important d'appliquer une nouvelle couche de gelée à base de miel et de gélose sur le sommet de la cage. Il est préférable de laver la housse de la cage et d'appliquer une nouvelle couche de gelée à chaque utilisation. Les parties supérieures souillées sont mises à tremper dans l'eau chaude pour déloger les restes de gelée. Il faut laver les bases en mousse de polystyrène avec de l'alcool à 70 % et asperger de l'eau distillée sur les cages après chaque transfert de matériel. Il est également important d'asperger de l'eau sur les cages deux fois par jour.

Pour éviter d'avoir à humecter de l'eau manuellement sur les cages d'exposition, on peut utiliser un système d'irrigation automatique. Ce genre de système consiste en une canalisation centrale munie de clapets solénoïdes jumelés à des buses à tous les 90 cm. Une minuterie électronique de précision à cycle de 24 heures est réglée de manière à ce que le système pulvérise pendant 3 à 4 secondes un nuage de fines gouttelettes toutes les 8 ou 12 heures. Pour obtenir une pulvérisation uniforme, il faut veiller à ce que la pression d'eau soit stable, l'eau, exempte de dépôts, et les buses, nettoyées correctement (figure 15).

Pour les élevages de masse, des cages d'exposition plus spacieuses (45 × 32 × 55 cm) pouvant accueillir jusqu'à 5 parasitoïdes femelles et 50 chenilles peuvent être utilisées (figure 15). La durée de l'exposition est de 2 à 3 jours. L'utilisation de ce type de cage ne permet pas de sauver de l'espace, mais elle réduit considérablement les manipulations. Nous recommandons une thermopériode de 22/15 °C [12/12 heures (jour/nuit)], une humidité relative de 95 %, une photopériode de 12/12 heures (L/O) et une intensité lumineuse de 50 $\mu mol \cdot s^{-1} m^{-2}$. L'abaissement de la température la nuit permet de prolonger la durée de vie des mouches et de ralentir l'alimentation des chenilles pendant la nuit. Il est important de maintenir un taux d'humidité d'exactement 95 % dans l'enceinte d'élevage. Pour ce faire, il est recommandé d'utiliser un système de minuterie permettant d'interrompre périodiquement le fonctionnement des humidificateurs afin d'éviter le déversement accidentel d'eau sur le plancher ou les comptoirs.

Une fois la période d'exposition expirée, les chenilles sont récupérées et remplacées par de nouvelles chenilles non parasitées, et ce jusqu'à ce que les parasitoïdes femelles meurent ou deviennent trop faibles pour voler. Les semis de chêne peuvent être laissés dans les cages jusqu'à ce qu'ils soient complètement défoliés.

– Élevage des chenilles parasitées. Une fois la période d'exposition terminée, les chenilles de spongieuse sont récupérées sur les plantes-hôtes à l'aide de petites pinces en acier inoxydable et transférées dans des contenants SOLO de 163 mL renfermant du milieu nutritif artificiel (figure 28, à gauche). Chaque contenant peut accueillir jusqu'à 30 chenilles, soit le contenu d'une cage d'exposition. La date à laquelle les chenilles sont transférées doit être indiquée sur chaque contenant. Une fois transférées, les chenilles sont soumises à une température de 22 °C pendant 2 à 3 jours. Ces conditions accélèrent le développement des insectes mais n'ont aucun effet sur la diapause. Cette mesure s'avère nécessaire parce qu'autrement, les chenilles plus petites peuvent tomber à travers les orifices percés dans le fond de l'unité d'élevage composée (figure 10) et mourir de faim. Pour induire la diapause chez le parasitoïde, il faut exposer les contenants à une thermopériode de 20/15 °C [12/12 heures (jour/nuit)], en présence d'une humidité relative de 50 % et d'une photopériode de 12/12 heures (L/O). Si l'objectif est plutôt de maintenir un élevage continu, les contenants doivent être exposés à une température

de 22 °C en présence d'une photopériode de 18/6 heures (L/O). Environ une semaine après l'ovolarviposition, avant que les larves matures quittent leur hôte (figure 27), les chenilles de spongieuse sont transférées dans un contenant permettant de les isoler des larves du parasitoïde (figure 28, à droite). Cette étape est importante, car autrement les puparíums peuvent être détruits par les chenilles non parasitées. Pour obtenir des puparíums de grande taille et en santé, il faut veiller à ce que les chenilles de spongieuse disposent de toute la nourriture voulue jusqu'à la sortie des parasitoïdes. Lorsque ce transfert est effectué, il faut veiller à ce que les chenilles soient exemptes de filaments, sinon les larves du parasitoïde risquent de s'empêtrer.

Le milieu nutritif doit également être frais et exempt de contamination. L'application du milieu nutritif sur la face interne du couvercle favorise une utilisation plus économique et élimine le risque de contamination par les déjections. Il est recommandé de conserver au réfrigérateur une grande quantité de couvercles en prévision d'une utilisation ultérieure.

- Récolte des puparíums. Les contenants d'élevage doivent être examinés tous les deux jours ou au moins deux fois par semaine. Les puparíums et les larves mobiles recueillis au fond des contenants en mousse de polystyrène sont transférés dans des contenants séparés, de manière à ce que les larves ne dérangent pas les puparíums par leurs mouvements. À chaque inspection du contenant, il faut éliminer toutes les déjections accumulées au fond et, au besoin, remplacer le couvercle retenant le milieu nutritif. Il faut également veiller à ce que le milieu nutritif n'obstrue pas les orifices percés au fond du contenant. Par ailleurs, comme elles consomment inutilement une importante quantité de nourriture, les chenilles du cinquième stade, manifestement non parasitées, doivent être éliminées. Des puparíums peuvent être trouvés jusqu'à 21 jours après la date indiquée sur le contenant. Le contenant d'élevage peut alors être éliminé.

- Manipulation des puparíums et hibernation. Les larves matures de l'*A. samarensis* sont encore pâles et molles et deviennent immobiles en l'espace de 3 à 4 heures. La formation du puparium survient 8 à 12 heures plus tard. Les puparíums, petits tonnelets bruns aux téguments sclérifiés, doivent être débarrassés des déjections et des filaments qui les recouvrent avec de l'eau distillée après avoir été placés sur une vitre. Il faut cependant éviter de les manipuler inutilement, car ils sont très fragiles et s'abîment facilement, comme le soulignent Godwin et Odell (1981), qui ont observé chez le *B. pratensis* des taux de mortalité de 50 à 70 % entre la formation du puparium et la pupaison. Une fois leurs téguments durcis, les puparíums nettoyés sont disposés de manière à ce qu'ils ne se touchent pas sur une couche de mousse de tourbe humide autoclavée de 1 cm d'épaisseur, dans une boîte de Petri (Falcon Plastics, 150 x 25 mm) (figure 29). La mousse de tourbe est suffisamment humide si aucune goutte d'eau ne s'en échappe. À des fins de protection contre les microorganismes, les puparíums sont alors recouverts d'une nouvelle couche de mousse de tourbe humide. Chaque boîte de Petri peut accueillir environ 500 puparíums. Les boîtes de Petri contenant les puparíums sont déposées sur un support à éprouvettes modifié au-dessus l'eau distillée dans un grand contenant en plastique pourvu d'un couvercle bien étanche (figure 30). En raison de ses propriétés antimicrobiennes, la tourbe protège les puparíums contre les infections fongiques (p. ex. *Rhizopus* sp., *Pacilomyzus farinosus*). Il faut également veiller à ce que le couvercle du bac d'eau soit bien fermé de manière à ce que le matériel ne soit pas directement exposé à l'air ambiant, souvent chargé de spores.

Si l'objectif est d'induire une diapause chez les puparíums à des fins d'hibernation, il faut entreposer ces derniers à une température de 13,5 °C en présence d'une photopériode de 12/12 heures (L/O) et d'un éclairage tamisé de manière à prévenir l'émergence non souhaitée des adultes. À cette température, les yeux des pupes à l'intérieur des puparíums commencent à prendre une teinte rouge après 30 jours. L'atteinte du stade adulte pharate survient après 42 jours (figure 31). Les puparíums sont alors exposés à une température de 8 à 10 °C pendant 10 jours, puis entreposés entre 2 et 4 °C pour une hibernation d'une durée maximale de 8 mois. En cas de transfert trop rapide à une température de 10 °C (c.-à-d. avant la formation des adultes pharates), les prépupes ne survivent pas à l'hibernation et finissent par mourir. En conséquence, les puparíums doivent être soumis à une période de préhibernation de 1 à 2 mois à 13,5 °C. Après une hibernation minimale de 3 mois, les puparíums peuvent être retirés des installations d'hibernation et mis à incuber, d'abord à 15 °C pendant 5 jours, puis entre 22 et 25 °C dans une cage d'émergence.

Si l'objectif est plutôt de maintenir un élevage continu, il faut exposer les puparíums nouvellement formés à une température de 20 à 25 °C. Toute exposition des puparíums nouvellement formés à une température de 15 °C pendant une période

minimale d'une semaine induit la diapause, au moins chez une partie du matériel.

- Nettoyage des cages et du matériel d'élevage. Tout le matériel et les cages doivent être nettoyés soigneusement. Avant chaque utilisation, les parois et les tablettes des incubateurs et des salles de culture doivent être lavées avec une solution de Sporicidin (agent sporicide fabriqué par Sporicidin International, Rockville, Maryland, États-Unis; distributeur au Canada : Canadawide Scientific Ltd., Ottawa). Les cages à housse de tulle doivent être rincées avec de l'eau chaude du robinet (pour enlever les restes de gelée à base de miel et de gélose), puis humectées à fond avec de l'éthanol à 70 % et séchées. Les housses de tulle présentant des traces de moisissure doivent être remplacées. Les cages tulle plus petites peuvent être désinfectées par exposition pendant 20 minutes à une lampe ultraviolette recouverte d'un capot de protection (« Steril Gard », Scientific Products ESBE, Ville Saint-Laurent, Qc). Pour éviter la contamination durant l'entreposage, les cages de tulle peuvent être déposées dans de grands sacs en plastique qui sont ensuite scellés hermétiquement. Toute la verrerie (contenants en plastique et flacons) et les tubes utilisés aux fins de l'accouplement des mouches doivent être lavés soigneusement dans une solution de détersif Sparkleen (Fisherbrand). Les contenants peu dispendieux (contenants SOLO et verres en mousse de polystyrène) peuvent être détruits après avoir été utilisés. Les contenants Eraware devraient par contre être immergés pendant 24 heures dans une solution diluée d'hypochlorite (eau de Javel à 2 %), puis séchés. Les chenilles de spongieuse et les milieux nutritifs inutilisés sont autoclavés dans des sacs à autoclave Fisherbrand. Pour tuer rapidement les insectes, on peut les placer dans des chambres froides à -15 °C. Les vieilles chenilles récupérées dans les contenants d'élevage sont tuées par immersion dans de l'alcool à 50 %. Les bouchons en caoutchouc mousse doivent être remplacés dès qu'ils présentent des signes de contamination par des moisissures. La surface des comptoirs et les murs internes des enceintes d'élevage doivent être lavés régulièrement avec du Sporicidin ou de l'alcool éthylique à 70 %.

- Production des parasitoides. Dans les conditions dans lesquelles se déroulent les élevages de masse, un parasitoide femelle produit en moyenne 30 puparíums durant sa vie. Ce nombre peut toutefois grimper jusqu'à 50 si les élevages sont réalisés avec extrêmement de minutie et moins de matériel (Quednau, 1993). Les nombres de puparíums récoltés à 2 jours d'intervalle en 1996 dans le cadre d'un élevage post-hibernation sont présentés à titre d'exemple à la figure 32. Dans les 100 cages utilisées, un écart de 14 jours a été observé entre les premières et les dernières cages préparées aux fins de l'exposition des parasitoides à l'hôte. Cette disparité est imputable au fait que la fin de la gestation n'est pas survenue en même temps chez toutes les femelles. Un pic distinct a été observé dans le nombre de puparíums recueillis après le dixième jour après la récolte du premier puparium. Ce phénomène est typique d'un insecte dont la ponte est étalée dans le temps (Quednau, 1993). Le plus grand nombre de puparíums récoltés au cours d'un intervalle de 2 jours s'élevait à 500. Au total, 4 597 puparíums ont été produits. Lors d'une expérience d'élevage similaire plus récente, ce nombre a été porté à 6 223 puparíums.

Le tableau 1 présente le nombre de puparíums d'*A. samarensis* produits au Centre de foresterie des Laurentides en 1996 et précise à quelles fins ces puparíums ont été utilisés. Le tableau 2 présente les principales causes de mortalité observées durant l'incubation des puparíums en post-hibernation et l'élevage de la deuxième génération. Divers facteurs difficiles à maîtriser peuvent entraîner des pertes considérables durant l'élevage, et le tableau 3 décrit l'action de certains d'entre eux. Récemment, la présence du *Leptomonas* sp. (Trypanosomidae) a été détectée dans des puparíums contenant des prépupes. Ces prépupes ne sont pas parvenues à se transformer en adultes et se sont décomposées.

En Europe, Carl et Kenis (1990) ont observé des taux d'émergence de 85 à 96 % parmi des puparíums de l'*A. samarensis* obtenus de chenilles de spongieuse récoltées sur le terrain et élevées par la suite en laboratoire à 26 °C en présence d'une photopériode de 18/6 heures (L/O). La diapause était inhibée lorsque l'action de ces conditions s'exerçait principalement entre la formation du puparium et la pupaison. Nous n'avons pas été en mesure d'obtenir des taux d'émergence aussi élevés au Centre de foresterie des Laurentides. Les conditions environnementales exactes qui prévalaient sur le terrain au moment des attaques de l'hôte, en Europe, n'ont pas été précisées. On peut toutefois supposer que ces conditions ne correspondaient pas aux conditions recréées en laboratoire au Canada.

Les pertes subies durant l'élevage peuvent être compensées par des taux élevés d'accouplement et de survie des parasitoides pendant la gestation et l'ovolarviposition.

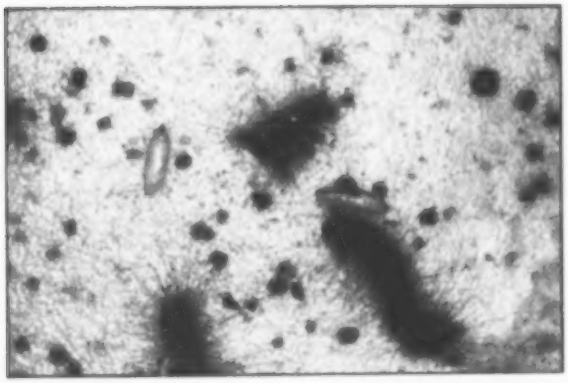

Figure 27. Larves matures de l'*A. samarensis* récemment sorties de leurs hôtes.

Figure 28. Contenants d'élevage renfermant des chenilles de spongieuse parasitées. À gauche : contenant simple, avec milieu nutritif disposé au fond. À droite : contenant composé, avec milieu nutritif disposé sur le couvercle.

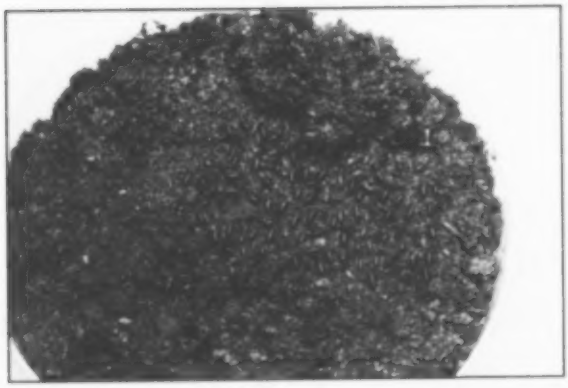

Figure 29. Puparíums d'*A. samarensis* sur de la mousse de tourbe autoclavée, dans une boîte de Petri.

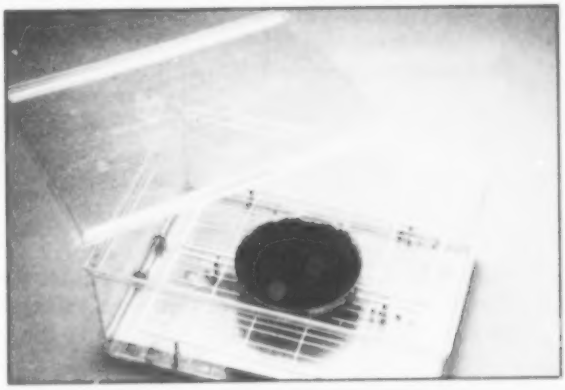

Figure 30. Contenant en plastique pour le dépôt des puparíums du parasitoïde sur la mousse de tourbe dans une boîte de Petri. Un couvercle hermétique est placé pour conserver une atmosphère saturée d'eau durant l'hibernation.

Figure 31. Adulte pharate d'*A. samarensis* extrait de son puparium.

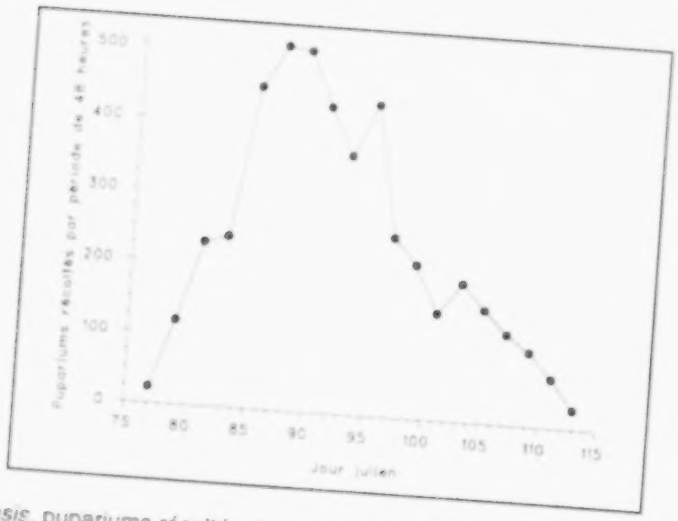

Figure 32. *A. samarensis*, pupariums récoltés durant l'élevage d'une deuxième génération avec 100 cages d'exposition (deux parasitoïdes par cage, roulement de 30 chenilles par cage tous les 3 jours). Nombre total de pupariums produits : 4 597.

ÉTAPES OPÉRATIONNELLES DE L'ÉLEVAGE

Les principales étapes opérationnelles de l'élevage de l'*A. samarensis* sont résumées à la figure 33, et les conditions ambiantes (température, humidité, lumière) requises dans chaque cas sont précisées. Comme dans la nature, le succès de l'élevage exige un parfait synchronisme entre le développement des plantes-hôtes et celui des chenilles de la spongieuse et des parasitoïdes gravides. Il est donc essentiel de bien planifier et synchroniser les différentes étapes de l'élevage.

Le calendrier de travail fourni à la figure 34 devrait aider les personnes qui envisagent de démarrer un élevage en vue de procéder à des lâchers sur le terrain. Pour des cohortes plus importantes (environ 200 femelles gravides), la durée d'une génération complète s'élève à 2½ mois en présence d'une thermopériode de 22/15 °C [12/12 heures (jour/nuit)], mais s'abaisse à 1½ mois à 22 °C en présence d'une photopériode de 18/6 heures (jour/nuit).

INSTALLATIONS

Pour mener à bien l'élevage de l'*A. samarensis*, il faut disposer des installations suivantes :

Salle n° 1. Humidifiée. Éclairage fluorescent. Thermopériode de 20/15 °C [12/12 heures (jour/nuit)]. Confinement des mâles fraîchement émergés, et exposition des insectes-hôtes au parasitoïde dans les cages d'exposition.

Salle n° 2. Humidifiée. Éclairage fluorescent de faible intensité. Thermopériode de 20/15 °C [12/12 heures (jour/nuit)]. Confinement des femelles fécondées durant la période de gestation.

Salle n° 3. Humidifiée. Éclairage fluorescent de faible intensité. Thermopériode de 15/10 °C [12/12 heures (jour/nuit)]. Confinement des mâles déjà accouplés.

Salle n° 4. Non humidifiée. Éclairage fluorescent. Thermopériode de 20/15 °C [12/12 heures (jour/nuit)]. Entreposage des contenants d'élevage (des deux types) contenant des chenilles de spongieuse parasitées, si l'objectif est d'induire la diapause chez les pupariums.

Salle n° 5. Non humidifiée. 22 à 25 °C. Éclairage fluorescent. Entreposage des cages d'émergence et des contenants renfermant des chenilles parasitées en cas d'élevage accéléré.

Incubateur. 25 °C, non humidifié. Obscurité. Incubation des masses d'oeufs de spongieuse.

Incubateur. 15 °C, humidifié. Éclairage fluorescent [18/6 heures (jour/nuit)]. Entreposage temporaire des pupariums en prévision de l'élevage de la deuxième génération.

Incubateur. 13,5 °C, humidifié. Éclairage fluorescent [12/12 heures (jour/nuit)]. Entreposage des pupariums avant l'hibernation.

Chambre froide. 2 °C, humidifiée. Obscurité. Entreposage des pupariums et des glands en hibernation.

Chambre froide. 7 °C, humidifiée. Éclairage fluorescent. Entreposage des semis de chêne dont le feuillage est encore tendre, ainsi que des masses d'oeufs de spongieuse.

Chambre froide. 7 °C, non humidifiée. Éclairage fluorescent. Entreposage des chenilles de spongieuse du deuxième stade sur milieu nutritif.

Serre.

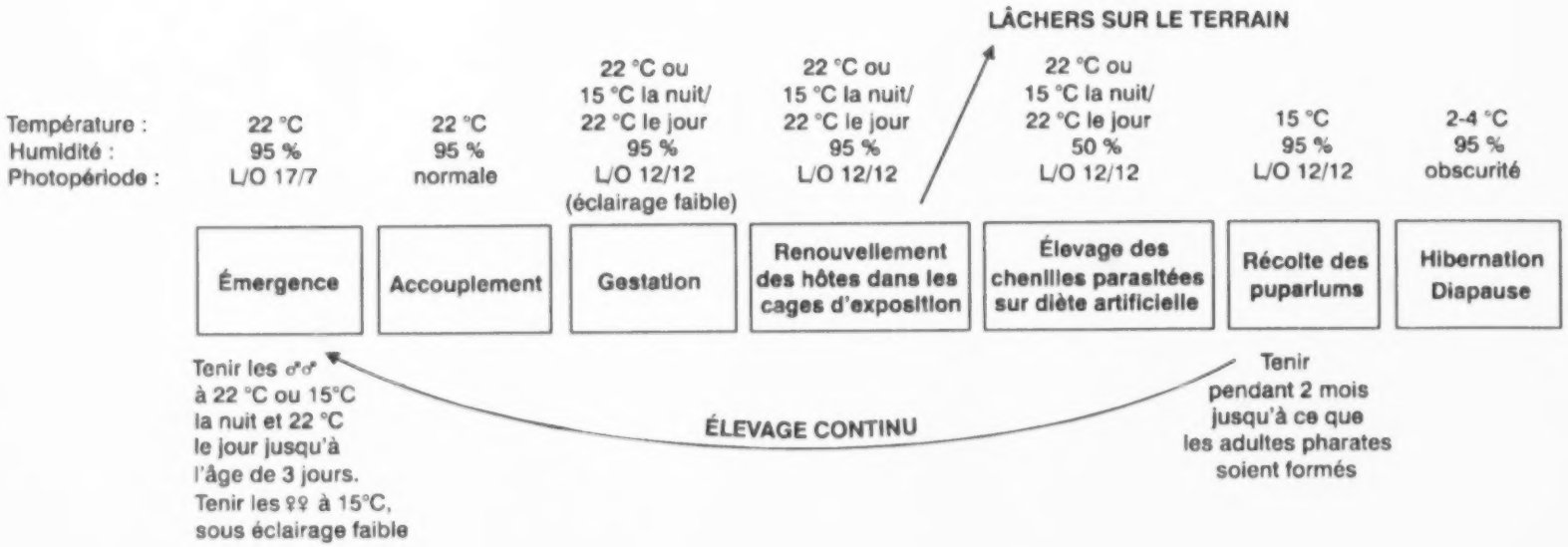

Figure 33. Étapes de l'élevage de l'*A. samarensis* et exigences environnementales abiotiques.

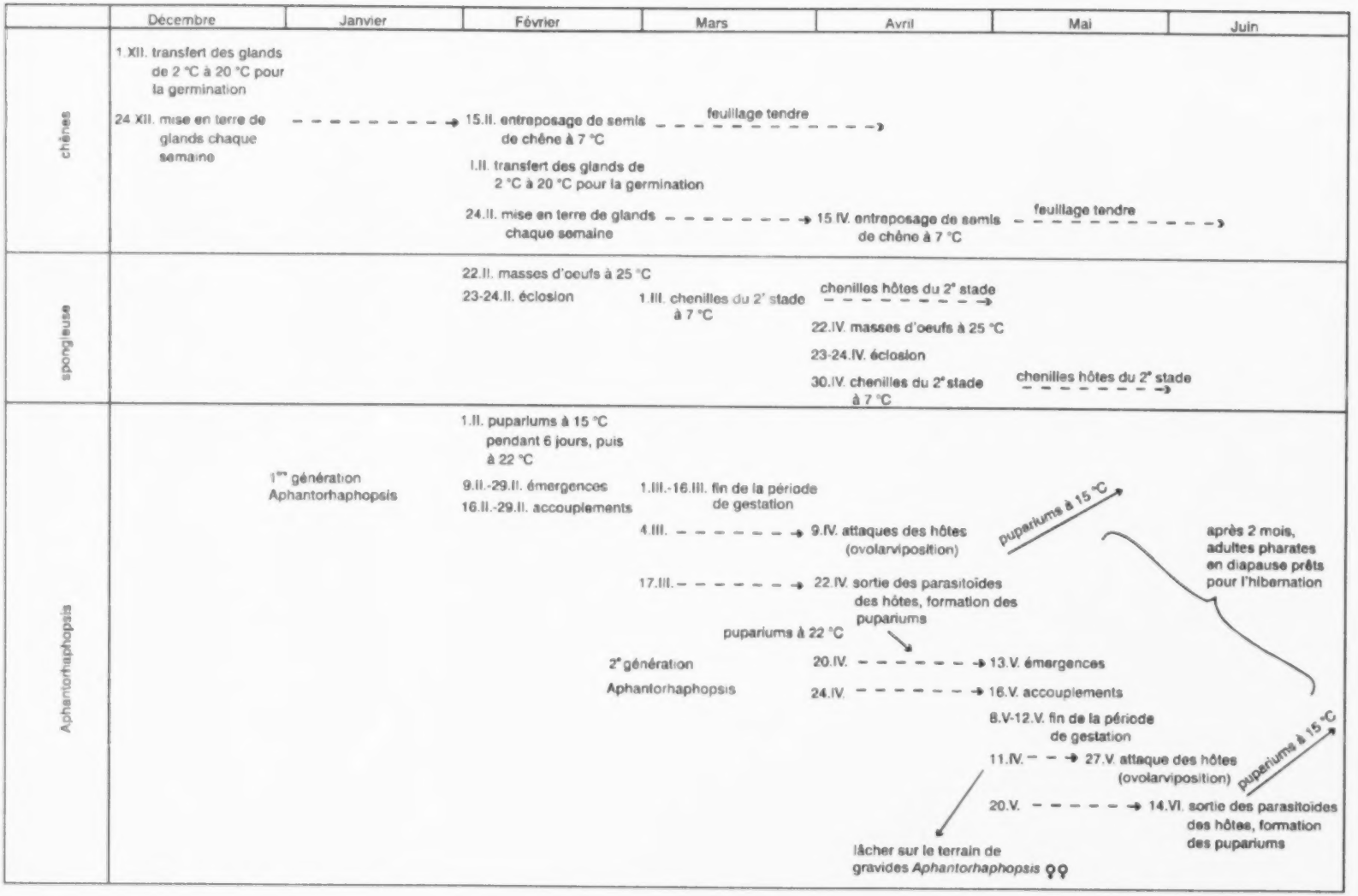

Figure 34. Calendrier des principales étapes de l'élevage de l'*A. samarensis* en laboratoire.

Tableau 1. Élevage de l'*A. samarensis* en 1996.

Élevage après hibernation (pupariums à 2 °C pendant 5 mois)	**Élevage de la 2e génération** (pupariums à 15 °C pendant 1 mois ou moins)	**Élevage de la 3e génération** (pupariums à 15 °C pendant 12 jours ou moins)
1 700 pupariums	4 587 pupariums	2 000 pupariums
↓	↓	↓
707 émergences (41 %) à 22 °C	2 485 émergences (55 %) à 25 °C	951 émergences (48 %) à 25 °C
↓	↓	↓
275 accouplements (80 %)	1 063 accouplements (83 %)	401 accouplements (85 %)
↓	↓	↓
200 ♀♀ survivantes après la gestation (70 %)	500 ♀♀ survivantes après la gestation (47 %)	182 ♀♀ survivantes après la gestation (45 %)
↓	↙ ↘	↙ ↘
4 587 pupariums	2 030 pupariums / 200 ♀♀ relâchées	132 ♀♀ conservées / 50 ♀♀ envoyées au USDA
		↙ ↘
		500 pupariums conservés / 1 000 pupariums envoyés au USDA

Tableau 2. Cause de mortalité chez les puparium de l'*A. samarensis*.

Adultes pharates incapables d'émerger	Tués par des champignons	Morts au moment de l'émergence	Pupes non formées	Puparium vides (contenu décomposé)	Adultes émergés en santé	Nombre total des puparium examinés
Élevage post-hibernation en 1996[1]						
274 (15 %)	551	16	88	74	707 (41 %)	1 714
Élevage de la deuxième génération en 1995[2]						
150 (11 %)	42	25	181	0	945 (70 %)	1 343
Élevage de la deuxième génération en 1996[2]						
120 (8 %)	42	48	274	83	861 (60 %)	1428

[1] Hibernation à 2 °C pendant 5 mois. Diapause apparemment non terminée chez 15 % des puparium.
[2] Puparium exposés à 15 °C pendant 2 à 3 semaines avant l'incubation. Diapause induite chez 8 à 11 % des puparium.

Tableau 3. Principales causes de mortalité observées durant l'élevage de l'*A. samarensis*.

Événement	% mortalité	Cause
Puparium en post-hibernation (avant l'émergence)	50 à 60	Champignons, adultes pharates incapables d'émerger
Puparium non hibernants (avant l'émergence)	25 à 40	Agents pathogènes, pupes non formées à l'intérieur du puparium, adultes pharates incapables d'émerger
Femelles durant la gestation	10 à 50	Bactéries, famine
Femelles ovolarvipares (gravides)	20 à 50	Faiblesse, dommages aux ailes

REMERCIEMENTS

Le Dr Gary Bernon, de l'USDA, Otis Methods Development Center (Massachusetts, États-Unis), nous a fourni régulièrement des masses d'oeufs de spongieuse, et Mme Deborah Winograd, du même établissement, a gracieusement accepté de réviser le manuscrit. Les importantes améliorations proposées par Claude Thireau et Roger Gagné ont considérablement facilité le déroulement des élevages. Enfin, les Drs V.G. Nealis, du Centre de foresterie du Pacifique, Victoria (C.-B.), et Vicente Sánchez, du USDA Forest Service, Hamden (Connecticut), États-Unis, ont également fait des commentaires fort utiles concernant le manuscrit. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à toutes ces personnes.

RÉFÉRENCES

Andersen, S. 1983. Phylogeny and classification of Old World genera of Siphonini (Diptera: Tachinidae). Entomol. Scand. 14:1-15.

Andersen, S. 1996. The Siphonini (Diptera: Tachinidae) of Europe. Fauna Entomol. Scand. 33, 148 pp.

Bell, A.R.; Owens, C.D.; Shapiro, M.; Tardif, J.R. 1981. Development of mass-rearing technology. *In* The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management. *Edited by* C.C. Doane and M.L. McManus. U.S. Dep. Agric., For. Serv., Tech. Bull. 1584. Washington, D.C. pp. 599-619.

Bonner, F.W. 1992. Collection and care of acorns. *In* Oak Regeneration: Serious Problems, Practical Recommendations. Symposium Proc. Sept. 8-10, 1992. Knoxville, Tennessee. *Edited by* D.L. Loftis and C.E. McGee. U.S. Dep. Agric., For. Serv., Southeastern For. Exp. Stn, Asheville, N.C. Gen. Tech. Rep. SE-84. pp. 290-297.

Carl, K.P.; Kenis, M. 1990. Annual Project Report for 1990. C.A.B. International Institute of Biological Control, European Station.

Godwin, P.A.; Odell, T.M. 1981. *Blepharipa pratensis* (Meigen) (Diptera: Tachinidae). *In* The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management. *Edited by* C.C. Doane and M.L. McManus. U.S. Dep. Agric., For. Serv., Tech. Bull. 1584. Washington, D.C. pp. 375-394.

Mills, N.J.; Carl, K.P.; Kenis, M. 1989. Annual Project Report for 1989. C.A.B. International Institute of Biological Control, European Station.

Mills, N.J.; Fisher, P.; Glanz, W.-D. 1986. Host exposure: a technique for the study of gypsy moth larval parasitoids under non-outbreak conditions. Proc. 18th IUFRO World Congress, Division 2, 2: 777-785.

Mills, N.J.; Nealis, V.G. 1992. European field collections and Canadian releases of *Ceranthia samarensis* (Dipt.: Tachinidae) a parasitoid of the gypsy moth. Entomophaga 37:181-191.

Nealis, V.G.; Quednau, F.W. 1996. Canadian field releases and overwinter survival of *Ceranthia samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae), for biological control of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). (Lepidoptera: Lymantriidae). Proc. Entomol. Soc. Ont. 127:11-20.

Odell, T.M.; Butt, C.A.; Bridgeforth, A.W. 1985. *Lymantria dispar*. *In* Handbook of Insect Rearing. Vol. 2. *Edited by* P. Singh and R.F. Moore. Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam. pp. 355-367.

Odell, T.M.; Godwin, P.A. 1979. Laboratory techniques for rearing *Blepharipa pratensis*, a tachinid parasite of gypsy moth. Ann. Entomol. Soc. Am. 72:632-635.

O'Hara, J.E. 1989. Systematics of the genus group taxa of the Siphonini (Diptera: Tachinidae). Quaest. Entomol. 25:1-229.

O'Hara, J.E. 1998. What's in a name? *Ceranthia samarensis* vs. *Aphantorhaphopsis samarensis*. The Tachinid Times 11:2-4.

Quednau, F.W. 1993. Reproductive biology and laboratory rearing of *Ceranthia samarensis* (Villeneuve) (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). Can. Entomol. 125:749-759.